

Uso de células troncales mesenquimales derivadas de grasa en el desarrollo de una nueva terapia para la incontinencia anal

Doctoranda: Cristina Abadía Isla

Director: Fernando de Miguel Pedrero

**Laboratorio de Terapia Celular del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz
(IdiPAZ)**

Octubre del 2012

Don Fernando de Miguel Pedrero, Investigador Miguel Servet de la Unidad de Terapia Celular del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz (IdiPAZ)

CERTIFICA

Que Doña Cristina Abadía Isla ha realizado bajo su dirección y tutela el trabajo que presenta para optar al grado de Doctora en Octubre del 2012 titulado **“Uso de células troncales mesenquimales derivadas de grasa en el desarrollo de una nueva terapia para la incontinencia anal”**, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación como tesis doctoral. Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por los que suscriben, encontrándola apta para ser presentada y defendida ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste a los efectos oportunos firma el presente certificado en Madrid a 24 de Julio del 2012



Dr. Fernando de Miguel Pedrero

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	17
ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	29
1. Incontinencia anal: realidad social	31
1.1. <i>Estructura e innervación del esfínter anal y causas de la incontinencia</i>	33
1.1.1. <i>Estructura</i>	33
1.1.2. <i>Inervación</i>	35
1.1.3. <i>Causas</i>	36
2. Terapia celular: uso de células troncales mesenquimales como posible tratamiento para la incontinencia anal	39
3. Estudios experimentales en incontinencia con MSCs	47
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Modelo animal de incontinencia anal	57
2. Baño de órganos	58
2.1. <i>Preparación de las tiras de músculo</i>	58
2.2. <i>Medida de contracción</i>	59
2.3. <i>Estudio de la contractibilidad muscular</i>	60
2.4. <i>Curva dosis-respuesta de los fármacos</i>	61
3. Aislamiento de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo de rata	62
4. Caracterización de células troncales mesenquimales	62
4.1. <i>Diferenciación</i>	63
4.1.1. <i>Adipogénica</i>	63
• Siembra y medio de diferenciación	63
• Tinción con Oil Red O	63
4.1.2. <i>Osteogénica</i>	64
• Siembra y medio de diferenciación	64
• Tinción rojo alizarina	64
• Actividad fosfatasa alcalina	65
4.2. <i>Citometría de flujo para marcadores de superficie</i>	66
4.3. <i>Unidades formadoras de colonias de aspecto fibroblástico (CFU-Fs)</i>	67
4.4. <i>Tiempo de duplicación</i>	67

5. Diferenciación miogénica	68
5.1. <i>Siembra y cultivo</i>	68
5.2. <i>RT-PCR</i>	68
5.2.1. <i>Diseño de oligos</i>	69
5.2.2. <i>Condiciones de la PCR</i>	70
5.3. <i>PCR a tiempo real</i>	71
5.3.1. <i>Condiciones de la PCR</i>	71
5.3.2. <i>Medida de cuantificación</i>	71
5.4. <i>Inmunocitoquímica</i>	72
6. Transducción de ASCs con un lentivirus para GFP	73
7. Terapia celular: efecto de las células troncales mesenquimales en el tejido dañado	74
7.1. <i>Estudio histológico</i>	74
7.2. <i>Estudio de microscopía de fluorescencia</i>	74
7.3. <i>Estudio de baño de órganos</i>	75
7.4. <i>Inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular Ki-67</i>	75
7.5. <i>Estudio de quimioquinas SDF-1 y MCP-3 en el tejido del esfínter anal sano, dañado y con ASCs a diferentes tiempos y expresión de receptores específicos de SDF-1 y MCP-3 en las ASCs con fenotipo miogénico y en proliferación.</i>	76
7.5.1.1. <i>Extracción del tejido y tiempos de estudio</i>	76
7.5.1.2. <i>RT-PCR</i>	76
7.5.1.3. <i>Diseño de oligos</i>	77
8. Análisis estadístico	78
RESULTADOS	79
1. Modelo animal de incontinencia anal: estudio histológico del daño en el esfínter	81
2. Baño de órganos	84
2.1. <i>Isoproterenol</i>	84
2.2. <i>Salbutamol</i>	85
2.3. <i>Carbacol</i>	86
3. Caracterización de las células troncales mesenquimales	87
3.1. <i>Diferenciaciones</i>	87
3.1.1. <i>Adipogénica</i>	87
3.1.2. <i>Osteogénica</i>	89
3.1.2.1. <i>Tinción rojo alizarina</i>	89
3.1.2.2. <i>Ensayo colorimétrico</i>	91
3.2. <i>Citometría de flujo para marcadores de superficie</i>	91
3.3. <i>Unidades formadores de colonias con aspecto fibroblástico (CFU-Fs)</i>	93
3.4. <i>Tiempo de duplicación</i>	93

4. Diferenciación miogénica de ASCs	94
4.1. <i>Cultivo celular</i>	94
4.2. <i>Expresión de marcadores moleculares de músculo liso y estriado</i>	96
4.2.1. <i>RT-PCR</i>	96
4.2.2. <i>qPCR</i>	98
4.2.3. <i>Inmunocitoquímica</i>	100
5. Transducción de ASCs con lentivirus para GFP	102
5.1. <i>Imágenes al microscopio de fluorescencia</i>	102
5.2. <i>Caracterización de las ASCs transducidas con lentivirus para GFP</i>	102
5.2.1. <i>Diferenciación adipogénica y osteogénica</i>	102
5.2.2. <i>Crecimiento celular de ASCs-GFP</i>	103
5.2.3. <i>Unidades formadoras de colonias (CFU-Fs)</i>	104
5.2.4. <i>Análisis de marcadores de superficie en ASC-GFP así como porcentaje de células positivas para GFP</i>	105
5.2.5. <i>Análisis de expresión mediante PCR a tiempo real de <i>cald1</i>, <i>smnt</i>, <i>MYH11</i> y α-actina</i>	106
6. Terapia celular: efecto de las ASCs en tejidos dañados	108
6.1. <i>Estudio histológico y detección de ASCs-GFP en los tejidos dañados</i>	108
6.1.1. <i>Tejido con ASCs sin diferenciar</i>	108
6.1.1.1. <i>Estudio histológico a los 4 días tras el daño</i>	108
6.1.1.1.1. <i>Tinción Hematoxilina/eosina</i>	108
6.1.1.1.2. <i>Imágenes al microscopio de fluorescencia</i>	109
6.1.1.2. <i>Estudio a las 4 semanas tras el daño</i>	110
6.1.1.2.1. <i>Tinción hematoxilina/eosina</i>	110
6.1.1.2.2. <i>Tinción de Masson</i>	111
6.1.1.2.3. <i>Imágenes de microscopía de fluorescencia</i>	112
6.1.2. <i>Tejido con ASCs con fenotipo miogénico</i>	112
6.1.2.1. <i>Estudio histológico a los 4 días tras el daño</i>	112
6.1.2.1.1. <i>Tinción hematoxilina/eosina</i>	112
6.1.2.1.2. <i>Imágenes de microscopía de fluorescencia</i>	113
6.1.2.2. <i>Estudio histológico a las 4 semanas tras el daño</i>	114
6.1.2.2.1. <i>Tinción hematoxilina/eosina</i>	114
6.1.2.2.2. <i>Tinción de Masson</i>	115
6.1.2.2.3. <i>Imágenes de microscopía de fluorescencia</i>	116
6.2. <i>Baño de órganos</i>	118
6.2.1. <i>Isoproterenol</i>	118
6.2.2. <i>Salbutamol</i>	119
6.2.3. <i>Carbacol</i>	120
6.3. <i>Inmunohistoquímica para Ki-67</i>	121
6.3.1. <i>Tejidos sanos con ASCs no diferenciadas</i>	121
6.3.2. <i>Tejidos dañados con ASCs-GFP en proliferación tras 4 días y 4 semanas del daño</i>	122
6.3.3. <i>Tejidos dañados con ASCs-GFP diferenciadas a fenotipo miogénico tras 4 días y 4 semanas del daño</i>	124
6.4. <i>Estudio de expresión de quimioquinas (SDF-1 y MCP-3) en tejidos dañados y sus receptores en ASCs durante la diferenciación miogénica</i>	125
6.4.1. <i>Expresión de receptores para SDF-1 y MCP-3 a lo largo de la diferenciación miogénica</i>	125
6.4.2. <i>Expresión de SDF-1 y MCP-3 en tejidos dañados así como en tejidos con células en proliferación y cultivadas en medio de diferenciación miogénico</i>	127

DISCUSIÓN	129
1. Estudio de contractibilidad del tejido y evolución histológica del daño en el esfínter	133
1.1. <i>Estudio de contractibilidad muscular en tejidos lesionados con ASCs</i>	133
1.2. <i>Efecto de las ASCs, en proliferación y con fenotipo miogénico, en la cicatrización del esfínter dañado</i>	136
2. Diferenciación miogénica y patrón de expresión de marcadores musculares	139
3. Expresión de receptores de quimioquinas (CCR1, CCR2 y CXCR4) en ASCs en proliferación y ASCs con medio de diferenciación, así como expresión de sus ligandos MCP-3 y SDF-1 en tejidos sanos y dañados	142
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomía del esfínter anal (referencia nº 17).	35
Figura 2: Inervación del recto y esfínter anal (referencia nº 17)	36
Figura 3: Proceso de diferenciación de las MSCs. Las células troncales mesenquimales pueden dar lugar a hueso, cartílago, músculo, médula, tendones, tejido adiposo además de otra serie de tejidos conectivos (referencia nº 40).	43
Figura 4: Factores paracrinos liberados por las MSCs que intervienen en los procesos de inmunomodulación, anti-apoptosis, angiogénesis, anti-fibrosis, migración y ayuda en el crecimiento y diferenciación de las MSCs y progenitores locales (referencia nº 40).	45
Figura 5: Imágenes de la cirugía realizada en las ratas.....	57
Figura 6: Imagen del baño de órganos.....	59
Figura 7: Registro de relajación de una tira de músculo sano a diferentes concentraciones de isoproterenol.....	61
Figura 8: Estudio histológico durante 4 semanas del daño en el esfínter mediante tinción de hematoxilina/eosina (imágenes A-J) así como por tinción de tricrómico de Masson (imágenes K y L)	83
Figura 9: Tinción Oil Red O de ASCs diferenciadas y no diferenciadas a adipocitos.....	88
Figura 10: Tinción rojo alizarina de ASCs diferenciadas y no diferenciadas a osteocitos.....	90
Figura 11: CFU-Fs de ASCs en pase 4.	93
Figura 12: Evolución morfológica, a lo largo de 6 semanas, del cultivo de ASCs con medio de mantenimiento como con medio de diferenciación con y sin dexametasona 95	95
Figura 13: Gel de agarosa al 1,5 %, de ASCs en pase 3 con medio de mantenimiento así como con medio de diferenciación miogénica con y sin dexametasona tras 6 semanas de cultivo, para MyoD1, Myf6, MYH2, Cald1, Smnt, MYH11, α -actina y β -actina.	97
Figura 14: Inmunocitoquímica de ASCs tratadas y no tratadas con medio de diferenciación miogénica a las 6 semanas para Cald1, Smnt y Myh2.	101
Figura 15: Imágenes de ASCs positivas para GFP.....	102
Figura 16: ASCs en pase 4, positivas para GFP, diferenciadas a osteocitos y adipocitos	103
Figura 17: CFU-Fs para ASCs-GFP en pase 4.....	104
Figura 18: Hematoxilina/eosina a los 4 días de haber realizado el daño y de haber inyectado 10^6 ASCs en proliferación.	109

Figura 19: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASCs-GFP en proliferación.	110
Figura 20: Hematoxilina/eosina de un tejido dañado con 10^6 ASCs en proliferación a las 4 semanas.	111
Figura 21: Tinción de Masson del tejido dañado con 10^6 ASCs en proliferación 4 semanas después de realizar el daño.....	111
Figura 22: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a las 4 semanas a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASCs-GFP en proliferación.	112
Figura 23: Hematoxilina/eosina a los 4 días de haber realizado el daño y de haber inyectado 10^6 ASCs con fenotipo miogénico.	113
Figura 24: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les inyectó 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico	114
Figura 25: Tinción hematoxilina/eosina de una sección a las 4 semanas con 10^6 ASCs con fenotipo miogénico.	115
Figura 26: Tinción de Masson de tejidos dañados tras 4 semanas a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASC con fenotipo miogénico.	116
Figura 27: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a las 4 semanas a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico.	117
Figura 28: Localización por microscopía de fluorescencia e inmunohistoquímica para Ki-67 de ASCs-GFP en proliferación a los 4 días y 4 semanas en tejidos sanos.	122
Figura 29: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejidos dañados con 10^6 ASCs-GFP en proliferación a los 4 días de realizar el daño.....	123
Figura 30: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejidos dañados con 10^6 ASCs-GFP en proliferación a las 4 semanas de realizar el daño.	123
Figura 31: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les inyectó 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico.....	124
Figura 32: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejido dañado con 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico a las 4 semanas del daño.....	124
Figura 33: Gel de agarosa al 1,5 % para CXCR4 y β -actina en ASCs diferenciadas a adipocitos.	126
Figura 34: Gel de agarosa al 1,5 % para CCR1, CCR2, CXCR4 y β -actina en ASCs con medio miogénico y en proliferación.....	126
Figura 35: Gel de agarosa al 1,5 % para SDF-1, MCP-3 y β -actina en tejidos sanos así como dañados a diferentes tiempos de estudio.....	127

Figura 36: Gel de agarosa al 1,5 % para SDF-1, MCP-3 y β -actina en tejidos sanos y dañados a diferentes tiempos de estudio a los cuales se les inyectó ASCs con fenotipo miogénico como en proliferación. 128

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Comparación de las curvas de relajación producidas por isoproterenol en el tejido dañado a los 4 días (gráfica en verde), 1 semana (gráfica morada) y 4 semanas (gráfica azul) respecto del tejido control (gráfica en marrón).....	85
Gráfica 2: Comparación de las curvas de relajación producidas por salbutamol en el tejido dañado a los 4 días (gráfica en verde), 1 semana (gráfica en morado) y 4 semanas (gráfica en azul), respecto de la control (gráfica en marrón).....	86
Gráfica 3: Comparación de las curvas de contracción producidas por carbacol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en verde), a la semana (gráfica en morado) y a las 4 semanas (gráfica en azul) respecto de la obtenida para tejidos control (gráfica en marrón).	87
Gráfica 4: Actividad fosfatasa alcalina de ASCs diferenciadas a osteocitos en pase 3.	91
Gráfica 5: Evolución del crecimiento celular de las ASCs a lo largo de 13 pases.....	94
Gráfica 6: Cuantificación relativa de la expresión de Cald1, Smnt, MYH11 y α -actina en ASCs con medio de diferenciación miogénico respecto de las no tratadas.	100
Gráfica 7: Comparación del tiempo de duplicación (horas) de ASCs positivas para GFP respecto de las que no.	104
Gráfica 8: Cuantificación relativa de la expresión de Cald1, Smnt, MYH11 y α -actina en ASCs-GFP cultivadas con medio de diferenciación miogénico en pase 5 respecto de las ASCs-GFP en proliferación.	107
Gráfica 9: Comparación de las curvas de relajación por isoproterenol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en marrón), tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les inyectó ASCs en proliferación (gráfica morada), tejidos dañados a los 4 días con ASCs con fenotipo miogénico (gráfica verde), respecto de las muestras control (gráfica en azul).....	119
Gráfica 10: Comparación de las curvas de relajación por salbutamol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en verde), tejidos dañados a los 4 días con ASCs en proliferación (gráfica morada), tejidos dañados a los 4 días con ASCs con fenotipo miogénico (gráfica azul),respecto de las muestras control (gráfica en marrón).....	120
Gráfica 11: Comparación de las curvas de contracción por carbacol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en verde), tejidos dañados a los 4 días con ASCs en proliferación (gráfica morada), tejidos dañados a los 4 días con ASCs con fenotipo miogénico (gráfica azul),respecto de las muestras control (gráfica en marrón).....	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de los anticuerpos utilizados en la caracterización de las ASCs por citometría de flujo.....	67
Tabla 2: Secuencia de las parejas de primer específicos de la especie <i>Rattus norvegicus</i> , temperaturas de “melting” correspondientes para cada uno de los primers, así como el número de entrada al NCBI para los genes β -actina, MyoD1, MYH2, Myf6, Cald1, α -actina, MYH11 y Smnt.....	70
Tabla 3: Características de los anticuerpos utilizados en la caracterización de las ASCs-GFP por citometría de flujo.....	74
Tabla 4: Secuencia de los primers específicos de la especie <i>Rattus norvegicus</i> , temperatura de melting de cada uno de ellos, así como los números de entradas al NCBI para los genes CCR1, CCR2, CXCR4, MCP-3 y SDF-1.	77
Tabla 5: Marcadores de superficie para ASCs en pase 9.	92
Tabla 6: Cuantificación de porcentaje de ASCs positivas para GFP así como estudio de marcadores de superficie para ASCs-GFP.	106

Agradecimientos

“Es de bien nacido ser agradecido”

No conozco a nadie que haya hecho la tesis y haya dicho que le ha resultado fácil. No sólo por tener que repetir cuarenta veces el mismo experimento porque los resultados que salen son completamente distintos a los publicados, o por tener que sacrificar fines de semana porque tienes que acabar algún experimento el domingo por la mañana o sin saberlo, cuando has empezado el experimento, te das cuenta de que el lunes siguiente es la Almudena y tienes que ir al laboratorio sí o sí, sino porque escribir el trabajo de cuatro años no es tarea fácil. Redactar ciertas partes de la tesis es más o menos rápido, si encuentras a la primera la manera de expresarte y no escribes cien veces el mismo párrafo porque no acaba de gustarte, pero jamás pensé que escribir los agradecimientos fuera tan complicado porque hay tantas personas a las que les quiero dar las gracias, que de antemano pido disculpas porque habrá un montón que se me van a pasar.

Dar las gracias en mi caso, empezando por **mis padres, Amelia y Fernando**, gracias a los cuales hoy soy lo que soy, porque aunque estemos a doce mil kilómetros de distancia, siempre están conmigo *“lejos pero cerca ¿verdad mamá?”* y **mis hermanas, Ame y Ester**, por las veces que he llegado a casa enfadada con el mundo y han estado allí para sacarme una risa, por todos los consejos que me han dado, en definitiva por ser ellas mismas aunque a veces hayamos tenido nuestros roces.

Val, que decirte que ya no sepas. Creo que decir **GRACIAS**, aunque sea en mayúsculas, negrita y subrayado se queda muy corto. Gracias por ser mi presente y mi futuro, por las veces que has aguantado mi mal genio (que no es poco) y mis salidas de tono sin mereértelo. Eres lo mejor que tengo.

Fer, gracias por darme la oportunidad de poder realizar la tesis, por haber confiado en mí para desarrollar este proyecto, porque aunque ha habido momentos un tanto complicados en estos 4 años de trabajo, creo que al final hemos conseguido hacer un buen trabajo.

Jesús, millones de gracias por haberme hecho las cosas tan fáciles cuando me hacía falta ayuda.

¡Maru! mi loca favorita...creo que en mis casi 30 años de vida no ha conocido a nadie como tú. No cambies nunca.

Gracias a toda la gente de la Unidad de Investigación que me ha ayudado a realizar la tesis y que me ha echado una mano cuando lo he necesitado.

Mis amigas de toda la vida **Anita, Mary, Tachi, Itziar, Ceci**....gracias por haberme hecho reír en tantísimas ocasiones, por las veces que nos hemos ido de juerga, por haberme aguantado tantas veces contándoos mis rollos laborables y no laborables, por haber estado en momentos en los que necesitaba hablar con alguien. Gracias por haber estado ahí siempre cuando me ha hecho falta.

Ame, Irene, Patri, Ana....siempre lo digo, pero es que es cierto ¡PARECEMOS MINISTRAS! y yo la primera, que conste. Aunque es muy complicado vernos, por todo el trabajo que tenemos encima, siempre espero con muchísima ilusión los poquitos días que nos podemos ver, las risas que nos echamos juntas recordando los días de la facultad, lo bien que lo hemos pasado las veces que nos hemos ido de cañas. ¡SOIS UNA PASADA CHICAS!

Pili y Martita....hemos pasado un montón de cosas estos últimos años, cambios de trabajo, bodas y ahora hasta embarazos. Sólo puedo pensar en el montón de cosas que nos quedan por vivir juntas. En fin que os puedo decir que sepáis. Muchas gracias por todas las veces que hemos quedado para salvar el mundo, por todos los viernes que comíamos en la facultad de derecho antes de ir a inglés (como las echo de menos), por todos vuestros consejos, personales y laborables. ¡SOIS INCREIBLES!

¡Tio Pedro! no me olvido de ti. No podría hacerlo. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar contigo hace 5 años, por las veces que te he pedido consejo y me lo has dado, por haberme echado un cable cuando lo he necesito. No te lo podré pagar jamás.

Mi yaya Fernanda y mi yayo Valentín. Todavía me acuerdo de todos los sábados por las tardes que nos sentábamos en la mesa viendo como jugabais a las cartas con vuestros amigos y lo mucho que me divertía. Gracias por todos los momentos increíbles que me habéis dado.

Mi yaya Amelia que aunque ahora nos vemos poco por la enorme distancia, se que siempre te has preocupado por mí, porque yo estuviera bien y porque fuera feliz **y mi yayo Ricardo**, que aunque hace ya tiempo que se fue, se que esté donde esté me ha echado un cable durante todos estos años.

¡Mi tía Cristina! gracias por ser mi tercera yaya.

¡Mi suegra favorita!, no sabes la cantidad de curro que me has quitado de encima en la última parte de la tesis...echa un vistazo y veras que muchas de las fotos que he puesto son gracias a ti. Millones de gracias por echarme un cable estos últimos meses. Eres la más grande.

Gracias a todos. Esta tesis es vuestra también.

Abreviaturas

"A buen entendedor, pocas palabras bastan"

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASCs	Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo
BM-MSCs	Células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
Cald1	Caldesmona
CCR1, CCR2	Receptores específicos para la quimioquina MCP-3
CFU-Fs	Colony forming units-fibroblast (unidades formadoras de colonias con aspecto fibroblástico)
CXCR4	Receptor específico para la quimioquina SDF-1
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Dexa	Dexametasona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNAse	Desoxirribonucleasa
EAE	Esfínter anal externo
EAI	Esfínter anal interno
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
dH ₂ O	Agua destilada
HC	Hidrocortisona
HS	Suero de caballo
iPS	Induced pluripotent stem cells (células pluripotentes inducidas)
M	Concentración molar

MCP-3	Monocyte chemotactic protein-3
ml	Mililitros
MSCs	Mesenchymal stem cells (células troncales mesenquimales)
MyoD1	Miogenic differentiation 1 (factor de diferenciación miogénico 1)
Myf6	Miogenic factor (factor miogénico 6)
MYH2	Cadena pesada de la miosina de músculo esquelético
MYH11	Cadena pesada de la miosina de músculo liso
Mw 100pb	Marcador de tamaño de 100 pb
ng	Nano gramos
nmoles	Nano moles
nm	Nano metros
qPCR	PCR a tiempo real
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehido
pNpol	Para-nitrofenol
pNpp	Para-nitrofenil fosfato
p/s	Penicilina/Estreptomicina
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SD	Ratas de la cepa Sprague-Dawley
SDF-1	Stromal derived factor-1
TBS	Tampón tris salino
Tm	Temperatura de “melting”
SFB	Suero fetal bovino

V	Voltio
μ	Micras
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

Introducción

“Nunca te acostarás sin saber algo nuevo”

1. Incontinencia anal: realidad social

Actualmente no existe una única definición de incontinencia anal. La primera definición aceptada fue: “paso de materia fecal incontrolada de forma continuada o recurrente durante al menos 1 mes en mayores de 3 años”^{1,2}. La *Sociedad Americana de Psiquiatría* propuso otra definición muy parecida salvo en la edad de los afectados, siendo ésta a partir de los 4 años de edad³. La *Rome fundation* propuso otra nueva definición: paso de materia fecal durante al menos 3 meses en mayores de 4 años”⁴.

El estudio epidemiológico es muy variable, en función de la definición que se escoja y de las características demográficas de la población, pero todos ellos coinciden en que la enfermedad es mucho más frecuente de lo que los estudios reflejan, debido a los grandes problemas sociales y psicológicos, rehuendo los pacientes a comunicar el problema a los médicos. Se calcula que sólo 1/3 de la población que padece este problema ha sido tratada⁵.

Hay ciertos factores de riesgo, de los cuales se han resaltado los siguientes:

- **Sexo femenino:** se ha señalado este factor como un valor que aumenta la prevalencia de esta patología⁶. Así, un estudio de 2009 en Estados Unidos, cifra la prevalencia en un 24%. Si sólo se toman en cuenta a las mujeres, aumenta el riesgo en aquellas que padecen obesidad o incontinencia urinaria, entre otras enfermedades⁷.

El daño producido durante el parto es la principal causa en el desarrollo de la incontinencia anal en mujeres previamente sanas. La incidencia de esta patología aumenta con el número de partos debido a heridas previas en el esfínter. Se ha sugerido que el daño en la musculatura del esfínter puede ser la causa de la incontinencia en casos en los que no existen otros síntomas ni daños⁸.

- **Edad:** aumenta, de forma significativa la prevalencia de la incontinencia, especialmente en ancianos. Cerca de un 10% de la gente mayor de 65 años la sufre y un 50% de las personas que viven en residencias la padecen⁹.
- **Deterioro general de la salud y limitaciones físicas**⁶.

El gran problema de la incontinencia no es solamente su frecuencia sino también las grandes **repercusiones sociales, psicológicas y económicas**. Estrictamente, las consecuencias físicas son muy escasas, como dermatitis perianal, pero las consecuencias psico-sociales son muy importantes: pérdida de confianza, aislamiento social, ansiedad ante episodios nuevos inesperados, etc., además también va asociada a la pérdida de trabajo¹⁰. Un análisis sistemático incluyendo resultados de dieciséis estudios, cifró la prevalencia en un 11-15% de los adultos¹¹. Otros estudios la cifran en un 2,2%, o un 1,4% de la población británica por encima de los 40 años de edad⁹.

Su impacto económico es complicado de estudiar. En Estados Unidos, en 1995, el coste anual estimado en incontinencia anal y urinaria en pacientes mayores de 65 años era de aproximadamente 26,3 millones de dólares¹². Xu y col.¹³, cifraron en 4.110 dólares el coste anual de una persona con incontinencia anal en Estados Unidos en el año 2010.

Actualmente, en la clínica, existen diferentes opciones en el tratamiento de la incontinencia anal. Pacientes diagnosticados con este tipo de patología se les somete primero a un tratamiento conservador, mediante un cambio en el estilo de vida (dieta, ejercicio regular, etc....) o bien con agentes farmacológicos. Otra opción es el “biofeedback”, el cual consiste en la realización de ejercicios de contracción esfinteriana, suelo pélvico y de la pared del abdomen para “reaprender” el mecanismo de la continencia⁹.

Si estos tratamientos previos no funcionan, se opta por la cirugía tal como la esfinteroplastia, esfínter artificial, reconstrucción de la mucosa anal o inclusive una colostomía permanente si el defecto persiste¹⁴⁻¹⁶.

1.1. Estructura e innervación del esfínter anal y causas de la incontinencia

1.1.1. Estructura

Una capa externa de músculo longitudinal y otra más interna de músculo circular rodean por completo el recto. Las propiedades de estas dos capas musculares son probablemente muy parecidas a las que se encuentran a lo largo del intestino. Ambas capas son músculo liso, las cuales generan contracciones con una frecuencia de 3-4 por minuto. El músculo longitudinal es capaz de generar cierta contracción basal, incrementando debido a esto, las contracciones que se dan en el mismo¹⁷.

Las catecolaminas son capaces de eliminar las contracciones espontáneas en ambas capas musculares y reducir el tono basal de la capa longitudinal, mientras que la activación de los receptores muscarínicos es capaz de generar la contracción muscular en ambos tipos de músculos. Es sabido que también existen α - β adrenoreceptores, tanto en el músculo circular como longitudinal, los cuales inducen la relajación muscular¹⁷.

Mientras que la capa muscular circular da lugar al esfínter anal interno (EAI), la capa longitudinal, a nivel del anillo anorrectal se mezcla con fibras del músculo elevador del ano para dar lugar a un conjunto de fibras longitudinales¹⁸. Al contrario que en el recto, la capa de músculo liso circular es capaz de generar tono basal, por lo que el EAI es un músculo liso en continua contracción¹⁸.

Este tejido presenta una respuesta ante la activación de receptores muscarínicos y β -adrenérgicos generando la relajación o, por el contrario, la contracción del mismo en el caso de que la activación sea de los receptores α -adrenérgicos¹⁷.

Así pues, un daño en el EAI conlleva una disminución en el tono muscular de reposo¹⁵.

El esfínter anal externo (EAE) es un cilindro elíptico de músculo estriado que envuelve el tubo de músculo liso¹⁸. Generalmente se describe como un músculo circular, formado por dos mitades las cuales funcionan juntas, formado principalmente por fibras musculares de tipo I (resistentes a la fatiga). Existen evidencias clínicas que demuestran que cada una de dichas mitades está inervada independientemente, de manera que si existe una denervación de una de las mitades, debido a un daño unilateral del nervio pudiendo, el reflejo nervioso quedará disminuido sólo en dicho lado. Estudios electrofisiológicos han puesto de manifiesto que únicamente el nervio pudendo es el que inerva el esfínter anal, existiendo una fuerte laterización¹⁹.

El EAE ha sido descrito como un anillo muscular dividido en tres partes: el músculo subcutáneo (anillo multifascicular de músculo estriado); la parte superficial es un músculo elíptico unido al coxis, y la parte más profunda del esfínter, el cual se encuentra unido al músculo puborrectal del suelo pélvico^{18,19}. Otros autores lo subdividen en dos partes: la parte profunda y la superficial. Los últimos estudios han propuesto una *estructura en lazos*. El lazo basal estaría formado por fibras longitudinales las cuales estarían unidas a la piel anterior del ano; el lazo medio estaría unido a la parte posterior del coxis y el lazo superior el cual estaría compuesto por el músculo puborrectal¹⁹, aunque los datos clínicos no apoyan esta esquema¹⁸.

El EAE es más parecido a un músculo único, unido por el ligamento anococcígeo de forma posterior al coxis y anteriormente al cuerpo perineal, no dividido en capas o laminado. De todas formas, se ha visto que hay diferencias entre sexos¹⁸.

De esta manera, EAE contribuye tanto en la presión basal como a la contracción voluntaria en respuesta a los cambios en la presión del recto. Daños en este tejido significaría un deterioro en su función y síntomas de fuga¹⁵.

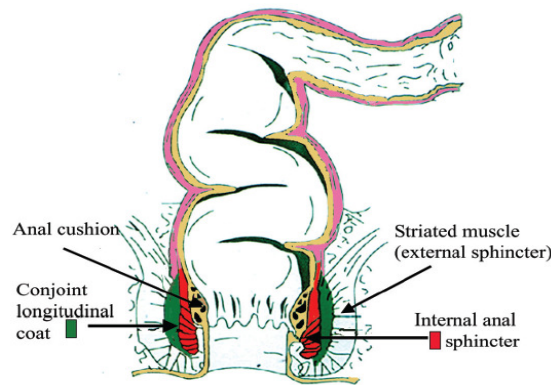


Figura 1: Anatomía del esfínter anal.

1.1.2. Inervación

La inervación del suelo pélvico es bastante compleja y todavía no está del todo clara. El control nervioso de los órganos del suelo pélvico es una coordinación entre el sistema nervioso motor autónomo y el somático además del sistema nervioso entérico.

Las motoneuronas que inervan tanto el esfínter como los músculos del suelo pélvico, se originan en el núcleo de Onuf, partiendo del asta anterior de la médula espinal, desde la S2 hasta la S4. Dichas fibras motoras dejan la espina dorsal en forma de raíces ventrales, las cuales se fusionan con las raíces dorsales para constituir el nervio espinal. Por otro lado, las fibras autónomas o parasimpáticas forman el plexo pélvico, mientras que las fibras somáticas (también llamadas plexo sacro), procedentes de la región S2-S4, forman el nervio pudendo, innervando el EAE¹⁹.

El EAI está innervado por nervios tanto del sistema simpático (L5) como parasimpático (S2-S4), siguiendo la misma ruta de los nervios que innervan el recto¹⁸.

El recto y el canal anal también presentan una innervación autónoma, tanto del sistema simpático (desde la T11-L2), el cual tiene un efecto inhibitorio sobre los movimientos peristálticos, así como ciertos componentes parasimpáticos del sistema nervioso autónomo (el nervio vago y S1-S3), los cuales presentan un efecto contrario al simpático¹⁹.

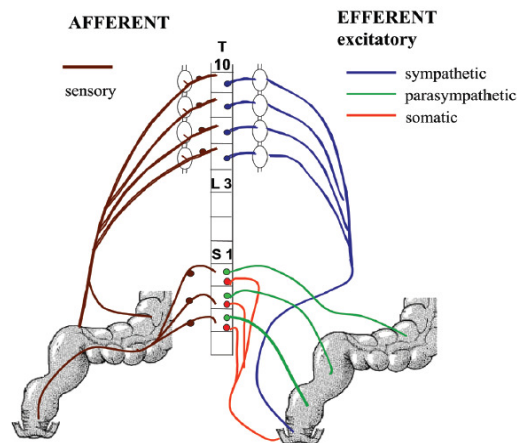


Figura 2: Innervación del recto y esfínter anal

1.1.3. Causas

La continencia está regulada mediante una compleja coordinación de la actividad entre el esfínter anal y el recto. El reflejo y la actividad voluntaria de ambos esfínteres, la onda puborrectal, la capacidad rectal y la sensibilidad tienen un papel importante en la continencia. La incontinencia es una manifestación de múltiples causas, que puede afectar a las distintas estructuras del aparato esfinteriano (EAE, EAI, suelo pélvico, ampolla rectal o a la innervación de cada una de las estructuras antes mencionadas).

Diferentes causas generan este tipo de patología. De forma muy amplia, se pueden clasificar de la siguiente manera⁹.

- **Anatómicas**

- Distensión vaginal y daño obstétrico
- Cirugía ano-rectal incluyendo esfinterotomía lateral, hemorroidectomía, cirugía debido a la existencia de fistulas anales.
- Fractura pélvica

- **Congénitas**

- Malformaciones anorrectales
- Meningocele y mielomeningocele
- Atresia anal
- Agenesia rectal

- **Neurológicas**

- Diabetes mellitus
- Esclerosis múltiple
- Lesiones en la médula espinal (como en el caso de los tumores, infecciones, etc....)
- Neuropatía en el nervio pudiendo debido a un daño en el mismo (distensión vaginal....)
- Desordenes en el sistema nervioso central.

- **Funcionales**
 - Malabsorción
 - Fistula anal
 - Diarrea
 - Incapacidades físicas
 - Abuso de laxantes
 - Síndrome de intestino corto
 - Hipersecreción de tumores rectales
 - Prolapso rectal

El desarrollo de técnicas que permitan el estudio de la incontinencia ha sido de gran importancia a lo largo del tiempo. Uno de los primeros métodos desarrollados fue un balón de agua que fuera capaz de medir la presión intrarrectal, desarrollado por Frenckner y Euler²⁰⁻²², con el nombre de manometría rectal. Desde entonces, se han ido desarrollando diferentes métodos con los que se pueden diagnosticar y valorar el grado de gravedad de la enfermedad, tal como la ecografía endoanal o test neurofisiológicos⁹.

Las técnicas de reparación actuales palian, parcial y temporalmente, los problemas de la incontinencia¹⁵, haciéndose inevitable la investigación y el desarrollo de nuevas vías que minimicen los riesgos en los pacientes. Una de las soluciones estudiadas en los últimos años es la medicina regenerativa con células troncales mesenquimales (**MSCs**), uno de cuyos objetivos es utilizar progenitores celulares diversos para potenciar los procesos innatos de curación así como suplir las posibles deficiencias que pudiera tener dicho proceso²³.

2. Terapia celular: uso de células troncales mesenquimales como posible tratamiento para la incontinencia anal

La *terapia celular o medicina regenerativa* se define como el uso de células vivas para mejorar o reemplazar funciones biológicas. Durante los últimos 50 años, el desarrollo de la biología celular y molecular, con sus grandes logros técnicos y científicos, ha hecho posible el poder restaurar o mejorar la función de órganos y tejidos lesionados por enfermedades o traumatismos. Desde el descubrimiento de las MSCs a finales de los años 60, ha habido un incremento paulatino en el número de estudios que se realizan con este tipo de células intentando conocer su origen, nicho así como las características que las hacen ser tan interesantes para la terapia celular.

Tras el boom inicial de las MSCs, este campo continúa todavía en sus inicios. La medicina regenerativa es, por tanto, un campo en continua expansión que se espera sea de uso generalizado en la clínica, lo que se traducirá en grandes avances médicos para las personas accidentadas, enfermas, etcétera.

Las MSCs fueron descritas inicialmente por Friedenstein y col.^{24,25} en 1968 como una población mononuclear derivada de la médula ósea, que cuando eran cultivadas *ex-vivo* recordaban, por su morfología, al fibroblasto. Estas células eran distintas a las células hematopoyéticas, pudiéndose identificar por su potencial de diferenciación a diferentes linajes celulares como osteocitos, adipocitos y condrocitos así como por la formación de colonias con aspecto fibroblástico (CFU-Fs) y por su capacidad de adhesión al plástico. El conocimiento actual sobre la biología de las MSCs es todavía limitado, aunque está ampliamente aceptado por la comunidad científica que este tipo celular tiene un origen mesodérmico^{26,27}.

En los últimos 25 años, las MSCs procedentes de la médula ósea, han sido objeto de multitud de estudios. Su capacidad de diferenciación a osteoblasto ha permitido que se realicen ensayos en la enfermedad hereditaria de la *osteogénesis imperfecta* o gracias a su capacidad de promover la revascularización se pudo realizar ensayos pre-clínicos en modelos animales de isquemia miocárdica^{28,29}.

Las MSCs poseen dos propiedades fundamentales que las hacen tan importantes: 1) *su capacidad de autorrenovación y su persistencia en el tiempo* a la vez que mantienen un cierto grado de indiferenciación o “inmadurez”³⁰ y 2) *por su capacidad de diferenciación en células que presentan funciones más específicas o especializadas*.

Este potencial se manifiesta en diferentes grados según el tipo de célula progenitora, facilitando la diferenciación hacia un único destino típico del tejido en que se encuentra (**células unipotenciales**), a diferentes tipos de células pertenecientes a tejidos u órganos que derivan de la misma capa embrionaria (**células multipotenciales**), o incluso aquellas que son capaces de diferenciarse a casi todos los tipos celulares de cualquier hoja embrionaria (**células totipotenciales**)³¹.

Las células embrionarias, claro ejemplo de células totipotenciales, son obtenidas a partir de la masa interna celular, capaces de dar lugar a todos los tejidos del cuerpo. Se ha podido demostrar que este tipo de células no sólo es capaz de diferenciarse a distintos tipos celulares como células hematopoyéticas, neuronas, células dendríticas, hepatocitos, osteocitos, condrocitos, adipocitos, células musculares, etc., sino que además presentan una capacidad de proliferación indefinida en cultivo, lo que permitiría tener una fuente renovable de células.

Una de las cuestiones que siempre se ha planteado es qué es lo que permite que estas células se mantengan en un estado inmaduro. Los factores de transcripción como Oct4, junto con Sox2 y E1A parecen contribuir al mantenimiento de dicho estado indiferenciado a través de las vías dependientes de FGF-4, Wnt y TGF- β . Estos factores, junto con el factor inhibitorio linfocitario (LIF), han llamado poderosamente la atención debido a que han demostrado, en estudios previos, tener un papel en la autorrenovación así como en los programas de desdiferenciación, incluyendo la tumorigénesis³⁰, mientras que las vías Akt y Erk parecen ser claves en el proceso de proliferación como en la supervivencia celular³². Si bien es cierto que la inmensa capacidad proliferativa es una de las características más importantes de estas células, un fallo en el control de su capacidad de diferenciación, proliferación o en el control de la apoptosis, puede dar lugar a la aparición de teratomas³³. Por este motivo, su uso terapéutico ha sido limitado, en cuanto a estudios pre-clínicos se refiere.

En los últimos años, las nuevas técnicas biotecnológicas han permitido “reprogramar” células adultas, revirtiendo el estado de diferenciación haciendo que vuelvan al estado embrionario (comúnmente denominadas **iPS**, del inglés “*induced pluripotent stem cells*”)²³. Las células iPS se obtuvieron por primera vez en el año 2006³⁴ a partir de fibroblastos de ratón utilizando retrovirus que incorporaban e inducían la expresión de varios genes exógenos (nanog, oct4, sox2 y c-myc) y en 2007 a partir de células humanas³⁵. Este logro se considera uno de los avances más importantes de la investigación con MSCs, ya que permite obtener células pluripotentes a partir de células adultas. Las iPS tienen aplicaciones como modelos para estudio de enfermedades, posibles usos terapéuticos (disminuyendo el rechazo en los trasplantes y sin la controversia del uso de células embrionarias) e investigaciones básicas. Más aún, esto podría facilitar el desarrollo de bases de datos de líneas celulares personalizadas permitiendo el descubrimiento, validación y desarrollo de nuevas terapias específicas para cada persona²³.

Se ha demostrado la existencia de MSCs en diversos tejidos en la edad adulta (*MSCs adultas*), sobre todo en aquellos con una tasa de renovación alta. En muchos órganos y tejidos adultos somáticos existen células de tipo troncal (figura 3), con mayor o menor capacidad de diferenciación, responsables de la regeneración que se produce de forma basal o estimulada en procesos traumáticos o patológicos. Un ejemplo de esto, son las MSCs derivadas de la médula ósea (**BM-MSCs**). Las BM-MSCs fueron las primeras en descubrirse, aunque en una proporción muy baja (1/10.000). Proporcionaron las bases de los primeros trasplantes de MSCs, ofreciendo una herramienta nueva en tratamientos para diversas enfermedades, tales como cáncer, enfermedades autoinmunes y genéticas.

Otro tipo de célula troncal adulta de origen hematopoyético son aquellas derivadas del cordón umbilical. Dichas células son capaces de proliferar *in vitro* durante un tiempo prolongado, y diferenciarse hacia células de las tres hojas embrionarias. Esto significa, que se podría tener una fuente de MSCs con características embrionarias, evitando de esta manera los problemas éticos debido al uso de células embrionarias. El uso de este tipo de células se ha llevado a la clínica, obteniéndose resultados prometedores en ensayos con niños que padecían anemia de Fanconi³³, o en la enfermedad de injerto contra huésped.

Además de la médula ósea, también se encontraron células de origen no hematopoyético con características similares a las de la médula ósea en el **tejido adiposo**, las cuales se pueden extraer mediante un proceso enzimático, obteniéndose lo que se denomina como *células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo* (**ASCs**).

Una de las ventajas de las ASCs es que se obtienen con gran facilidad, en gran número y proliferan rápidamente en cultivo, haciendo de ellas una fuente muy atractiva para la ingeniería tisular. Estas células presentan características de multipotencialidad, con capacidad de contribuir a la regeneración de hueso, cartílago y músculo (tejidos de origen mesodérmico),

aunque también hay que tener en cuenta, que en función del origen del tejido, la capacidad de proliferación, diferenciación así como la expresión de los marcadores de superficie varían de unas a otras²⁷.

En 1961, se descubrieron las células satélites, llamadas así ya que se encontraban situadas en la superficie de la miofibra, bajo la membrana basal. Estas células se encuentran quiescentes, activándose su proliferación y diferenciación en el momento en el que el músculo estriado sufre un daño. El debate acerca de la fuente de regeneración de mioblastos sigue abierta, ya que no hay evidencias claras de que las células satélites sean progenitores miogénicos³⁶.

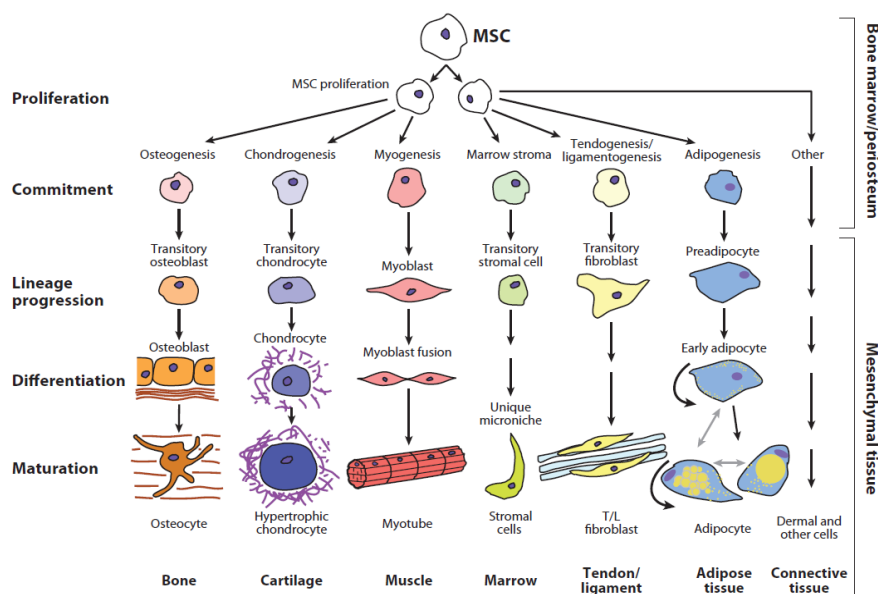


Figura 3: Proceso de diferenciación de las MSCs. Las células troncales mesenquimales pueden dar lugar a hueso, cartílago, músculo, médula, tendones, tejido adiposo además de otra serie de tejidos conectivos.

Una de las características principales que hace que las MSCs sean una opción terapéutica muy prometedora es que son células inmunoprivilegiadas, una característica relevante que permitiría su trasplante alogénico y/o xenogénico, aunque el mecanismo exacto por el cual éstas actúan sobre el sistema inmune todavía no está claro del todo.

Parecen ser capaces de modular la función de las células T, incluyendo su activación, así como inhibir la proliferación, diferenciación y quimiotaxis de las células B^{23,27,37}.

Otra razón para la aplicación terapéutica de las MSCs ha sido su capacidad de migración a los sitios de inflamación causados por lesiones en los tejidos. Aunque el mecanismo por el cual las MSCs son reclutadas hacia los tejidos con procesos inflamatorios, o cómo son capaces de atravesar la capa de células endoteliales no es del todo conocido, se cree que la dirección de migración que siguen estas células es mediante un gradiente de concentración de quimioquinas liberadas por los tejidos dañados³⁸⁻⁴⁰. Si bien es cierto que diferentes grupos de investigación han realizado estudios sobre la expresión de receptores de quimioquinas en MSCs humanas, los cuales han arrojado diferentes resultados, la conclusión de todos ellos ha sido la capacidad de las MSCs de expresar multitud de receptores de quimioquinas. El hecho de que estas células expresen tal variedad de receptores, sugiere el potencial de las MSCs de migrar hacia diferentes tejidos donde podrán ayudar en la reparación tisular o amortiguar la inflamación⁴⁰.

Además de tener capacidad de migración y un efecto inmunomodulador, estas células son capaces de actuar sobre los procesos de angiogénesis, apoptosis, anti-fibrosis además de ser un soporte en el proceso de crecimiento y diferenciación de MSCs locales, mediante la liberación de un amplio abanico de factores paracrinos⁴¹.

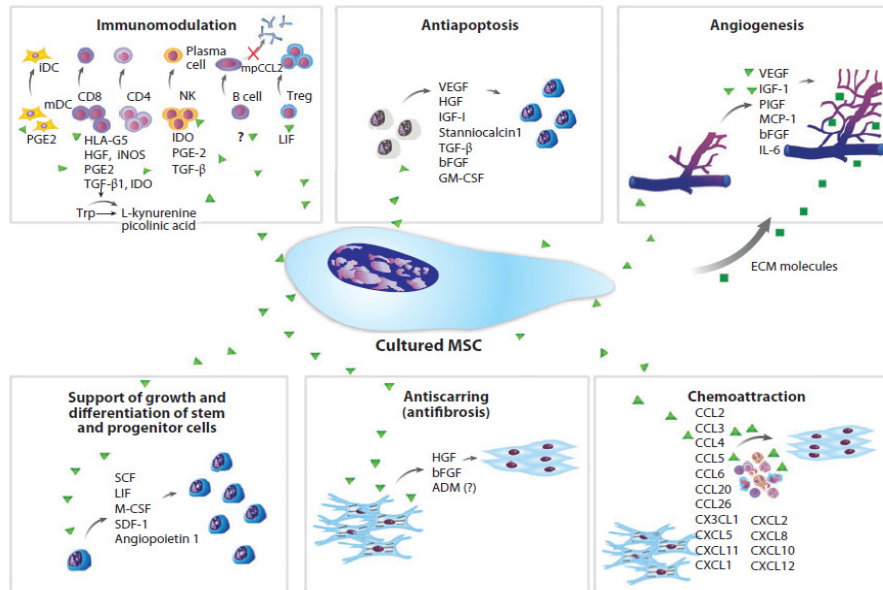


Figura 4: Factores paracrinos liberados por las MSCs que intervienen en los procesos de inmunomodulación, anti-apoptosis, angiogénesis, anti-fibrosis, migración y ayuda en el crecimiento y diferenciación de las MSCs y progenitores locales

El concepto de plasticidad ha sido recientemente adoptado para definir la capacidad de las MSCs de diferenciarse, bajo ciertas condiciones del microambiente, hacia tipos celulares distintos al de su tejido de residencia, independientemente de la designación inicial de la capa germinal. Al principio, este hallazgo causó gran impacto, debido al gran potencial de diferenciación que presentan estas células, abriendo una nueva vía en la curación de enfermedades genéticas y degenerativas. Sin embargo, estudios recientes en los que se plantea la plasticidad o transdiferenciación de las MSCs, ésta puede ser explicada debido a la fusión de las MSCs con las células locales. El mecanismo subyacente de la pluripotencialidad o de la transdiferenciación es desconocido hasta el momento⁴².

La ventaja de utilizar MSCs adultas, respecto de las embrionarias, es la posibilidad de poder ser obtenidas directamente del individuo sometido a tratamiento⁴³, evitando de esta manera el rechazo, lo que constituye una de las fuentes más valiosas y, en segundo lugar, su mayor grado de compromiso de diferenciación y proximidad al tejido que interese.

El interés que generan estas células en la actualidad se debe a dos motivos principalmente. Por un lado el conocimiento de su biología, tanto en estados de normalidad como en los patológicos, debido al papel tan importante que desempeñan en el desarrollo y mantenimiento de órganos y tejidos^{44,45} y por otro lado, la investigación aplicada y biotecnológica de las MSCs ofrece la posibilidad de desarrollar nuevos procedimientos terapéuticos para reparar o sustituir tejidos en enfermedades crónicas o que en la actualidad no tienen un tratamiento adecuado o con resultados no deseables a corto o largo plazo, pudiendo ser su estudio y caracterización la clave en el desarrollo de nuevas terapias celulares o génicas que a medio o largo plazo podrían convertirse en una opción factible en la clínica^{46,47}.

Por lo tanto, la importancia de este tipo de células radica en el hecho de constituir el material celular fundamental para la construcción de organismos y generación de la diversidad de los diferentes tipos celulares especializados que aparecen durante el desarrollo. Incluso, una vez completada la organogénesis, pueden ser las responsables del mantenimiento y reparación de los órganos y tejidos necesitados de una renovación celular continuada.

Aunque la existencia de MSCs ha sido demostrada en muchos órganos y/o tejidos, la localización exacta de las mismas todavía no está del todo clara debido a la falta de un marcador específico bien definido. Se han aunado esfuerzos en el desarrollo de un perfil de marcadores moleculares específico de MSCs, lo que permitiría una mejor caracterización y aislamiento de las mismas, conocer la localización exacta de las mismas en los órganos/tejidos³³ y saber si dicho perfil podría aplicarse a las diferentes MSCs obtenidas de los diferentes tejidos³⁰.

Una clara definición de los mecanismos por los cuales las MSCs son generadas y mantenidas en los distintos órganos ayudaría a elucidar sus características biológicas y sus posibles usos, además de revelar aspectos nuevos relevantes en el desarrollo pre y postnatal²⁴.

3. Estudios experimentales en incontinencia con MSCs

Una herramienta fundamental en el estudio de la incontinencia anal es la obtención de un modelo animal, que permita reproducir la patología lo más fielmente posible y que además permita el ensayo de nuevas terapias. Principalmente, estos modelos animales se han desarrollado en rata⁴⁸⁻⁵², conejo¹⁴⁻¹⁶, o incluso en algunos casos en zarigüeya.

Como se ha mencionado anteriormente, hay diversas causas por las que una persona puede padecer esta patología, por lo que no hay un modelo animal canónico sobre el que poder estudiar la incontinencia, pudiendo hacer el daño mediante una sección directa sobre los esfínteres^{14,15,50} (técnica que simula el daño generado por una episiotomía durante el parto) como por un daño en el nervio pudiendo^{39,48,49,52} o incluso generando animales que padezcan diabetes mellitus⁵³, ya que es sabido que esta enfermedad puede generar alteraciones en el mecanismo de la continencia.

Son varios los estudios que se han realizado en los últimos años de reparación y regeneración del esfínter (tanto el esfínter urinario como anal) con terapia celular. Yiou y col. en 2002⁵⁴ estudiaron la reparación del esfínter urinario mediante el uso de células satélite, demostrando por primera vez que las células que habían inyectado eran capaces de participar en la regeneración de un esfínter urinario dañado. Se comprobó que a los 7 días de la inyección el diámetro de las miofibras esfinterianas formadas *de novo* eran significativamente mayores en los animales tratados que en los controles.

En 2007 Furuta y col.⁵⁵ publicaron una revisión sobre las posibles alternativas de tratamiento de la incontinencia urinaria. Propusieron el uso de MSCs derivadas del músculo como una alternativa terapéutica plausible y eficaz en el tratamiento de la incontinencia urinaria en un modelo de rata. La inyección de MSCs (tanto MSCs derivadas de músculo como ASCs) en medio de la uretra generó una mejoría en la capacidad de contracción del esfínter urinario.

Lorenzi y col.⁵⁰, propusieron el uso de BM-MSCs como una alternativa a las técnicas actuales en un modelo de rata de incontinencia anal mediante una sección directa de ambos esfínteres. Sus estudios muestran que el uso de este tipo de terapia aumenta la formación de nuevos miotubos y miofibras e incrementa la contractibilidad de los esfínteres anales después del daño y la reparación.

En el mismo año, Kang y col.⁴⁹, plantearon el uso de MSCs derivadas del tejido muscular como una nueva vía en el tratamiento de la incontinencia anal. Pudieron observar que las células inyectadas en el esfínter, previamente dañado, no sólo se habían integrado dentro de la capa muscular sino que además se habían formado nuevas fibras musculares en la zona de la inyección.

Hay otros autores, como Aghaee-Afshar¹⁴ que compararon el posible efecto de las MSCs de cordón umbilical frente al de las BM-MSCs, en un esfínter dañado. Observaron células marcadas con BrdU en la zona de la inyección así como nuevas fibras musculares en la zona del trasplante, sugiriendo de esta manera que las células trasplantadas contribuyeron a la formación de nuevo tejido muscular en el sitio de la herida.

También se han realizado estudios sobre el posible papel de las Sonic Hedgehog en la aparición de alteraciones rectales en la infancia⁵⁶.

En los años 2004 y 2009^{57,58}, en el Hospital Universitario de La Paz se realizaron dos ensayos clínicos en el tratamiento de fístulas perianales con ASCs. En el ensayo clínico en fase I se llegó a la conclusión de que este tipo de células eran seguras y fiables en el tratamiento de este tipo de patología. En el ensayo clínico en fase II se analizó la eficacia en el cierre de la fístula utilizando dos tratamientos distintos: ASCs con fibrina frente al tratamiento clásico, únicamente la fibrina. Se observó que los pacientes a los que se les había implantado la fibrina con ASCs presentaban una mejor calidad de vida, frente a los que únicamente se les había tratado con fibrina.

En el año 2010, Frudinger y col.⁵⁹ llevaron a cabo un ensayo clínico en mujeres que padecían incontinencia anal debida a un daño obstétrico, utilizando en este caso MSCs derivadas del músculo. Observaron que la calidad de vida de las pacientes mejoró después de la operación, aunque no encontraron ningún cambio fisiológico en ninguno de los esfínteres.

.

Objetivos

“Quien mucho abarca, poco aprieta “

A la luz de los antecedentes expuestos anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos en el presente estudio

1. Desarrollar un modelo animal de incontinencia anal mediante sección de ambos esfínteres, evaluando histológica y funcionalmente el daño realizado.
2. Diferenciación *in vitro* de ASCs a células con fenotipo muscular, analizando la expresión de marcadores típicos musculares, tanto de músculo liso (**α -actina, cadena pesada de la miosina de músculo liso (MYH11), caldesmona (cald1) y smoothelin (smnt)**) como de músculo estriado (**MyoD1, Myf6 y cadena pesada de la miosina de músculo estriado (MYH2)**).
3. Estudio de la capacidad proliferativa así como del efecto en la cicatrización y en la contractibilidad del esfínter anal dañado de las ASCs en proliferación como tratadas con medio de diferenciación miogénico.
4. Estudio de receptores de quimioquinas, **CCR1, CCR2 y CXCR4**, en ASCs en proliferación como cultivadas en medio de diferenciación miogénico, así como expresión de sus ligandos, **SDF-1 y MCP-3**, en los tejidos dañados.

Material y Métodos

“Despacito y buena letra que el saber hacer las cosas bien, importa más que el hacerlas”

1. Modelo animal de incontinencia anal

Hembras SD de entre 200-300 g., en condiciones *ad libitum*, fueron anestesiadas con isofluorano al 2%, inyectando adrenalina en la zona perianal como agente vasoconstrictor. Se retiró toda la grasa de la zona y se hizo un corte longitudinal tanto del músculo liso como del estriado sin llegar a cortar la mucosa, seccionando de esta manera tanto el EAI y EAE⁵⁰ (figura 5). Se cerró la herida con Vicryl 5-0, tratando a los animales con Tramadol a una concentración de 20 mg/kg de rata durante las primeras 24 horas tras la operación.

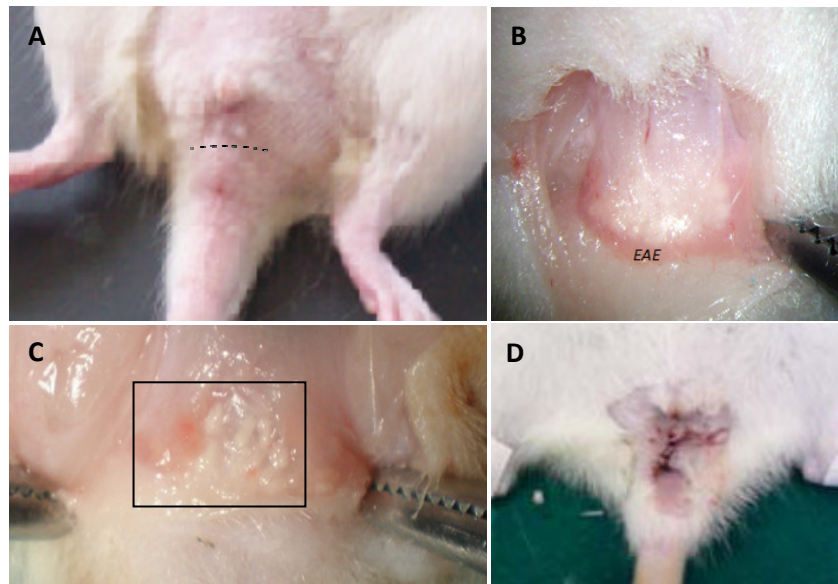


Figura 5: Imágenes de la cirugía realizada en las ratas. Imagen A: corte de la piel entre la vagina y ano; imagen B: exposición del EAE; imagen C: sección longitudinal del esfínter, dejando expuestas glándulas anales y mucosa; imagen D: cierre de la herida. Líneas punteadas en la imagen A, señala la zona por donde se abrió la piel. Recuadro negro en la imagen C se marca el daño en el esfínter

Se hicieron **4 grupos experimentales**: animales **control** y animales con **sección completa de ambos esfínteres a diferentes tiempos** (4 días, 1 y 4 semanas, cada uno de ellos con una n=3). Para evaluar la lesión realizada, se realizaron tinciones de hematoxilina/eosina y tricrómico de Masson.

Para ello, se sacrificaron los animales mediante una inyección intracardiaca de cloruro potásico (KCl) 1 M extrayendo el canal anal y fijándolo en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 1 semana. Posteriormente, se incubó el tejido durante al menos 24 horas en sacarosa al 30% y se incluyó en OCT (Tissue-Tek, Sakura), guardándolo a -80°C hasta su uso. Se hicieron cortes a 5 µm con un criostato Leica CM 3050S. El programa de obtención de imágenes fue el Image Pro Plus.

Todos los procedimientos quirúrgicos están aprobados por el comité de ética de experimentación animal de IdiPAZ (CEBA 15-07) y se ajustan a los principios establecidos en la directiva 2010/UE, del consejo del 22 de Septiembre del 2010 y del Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre sobre la protección de los animales usados en la experimentación y otros fines científicos

2. Baño de órganos

Para analizar la evolución de la capacidad contráctil del músculo tras el daño, se hizo un estudio en baño de órganos, usando diferentes fármacos para contraer y relajar el músculo y a distintos tiempos (4 días, 1 y 4 semanas tras el daño, cada uno de ellos con una n=3)⁶⁰⁻⁶⁹.

2.1. Preparación de las tiras de músculo

Los animales se sacrificaron como se ha descrito previamente, extrayendo inmediatamente el canal anal y transfiriéndolo a una solución fisiológica de Krebs (mM): KCl 4,6, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄·7H₂O 1,2, NaCl 115, NaHCO₃ 25, CaCl₂·2H₂O 2,5, glucosa 11,1. Se limpio cuidadosamente el tejido, quitando cualquier tejido que no fuera músculo. El canal anal se abrió longitudinalmente, linealizándolo y quitando la mucosa, dejando únicamente el músculo liso y estriado para su posterior uso.

2.2. Medida de contracción

Las tiras de músculo se anudaron por los dos extremos y se transfirieron al baño de órganos, el cual contenía 5 ml de la solución de Krebs a 37°C y oxigenada con carbógeno. Uno de los extremos de la tira se ancló al fondo del pocillo y el otro extremo se anudó al transductor de presión isométrico TRA 023 (LETICA), el cual estaba conectado a un amplificador Quad Bridge Amplifyer ML 118 (AD Instruments) y éste a su vez a un sistema de adquisición de datos Power Lab 4/30 (ML 886/P; AD Instruments). Tras 90 minutos equilibrando el tejido, se ejerció una tensión basal de 0,6 - 0,7 g sobre las tiras de músculo para, posteriormente, estimular el tejido muscular con diferentes fármacos (figura 6A y B). Los datos se registraron y analizaron mediante el programa ChartPro 5 (AD Instruments).

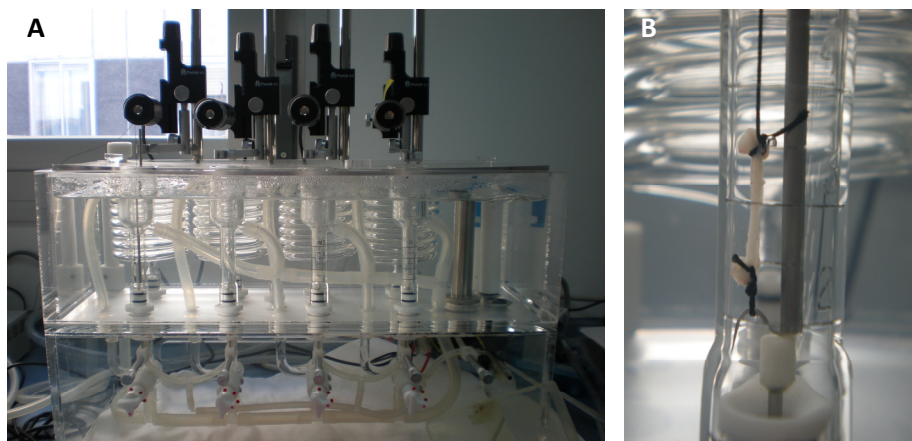


Figura 6: Imagen del baño de órganos. Imagen A: Baño de órganos de 4 pocillos; Imagen B: Imagen de una tira de músculo en solución de krebs.

2.3. Estudio de la contractibilidad muscular

Para estudiar las pautas de contracción y relajación del músculo, se utilizaron distintos tipos de fármacos con acción a través de receptores β -adrenérgicos (isoproterenol y salbutamol), muscarínicos (bethanecol y carbacol) o directamente sobre la adenilato ciclasa sin necesidad de receptores de membrana (forskolina). Se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-5} hasta 10^{-10} M de los mismos, analizando el efecto de su adición acumulativa sobre el músculo (figura 7), excepto del bethanecol y la forskolina los cuales se añadieron a una concentración de 10^{-5} M una única vez. El bethanecol se usó para generar la contracción inicial, y la forskolina para obtener la relajación máxima del músculo.

- *Bethanecol*: Agonista de receptores muscarínicos tipo M3 el cual no es susceptible a la degradación por la acetilcolinesterasa, permitiendo de esta manera que la contracción muscular sea mucho más prolongada y estable en el tiempo.
- *Isoproterenol, Salbutamol*: Ambos fármacos son agonistas de receptores β -adrenérgicos. El isoproterenol es un agonista inespecífico mientras que el salbutamol es específico de receptores β_2 . Ambos actúan de la misma manera, aumentando la concentración intracelular del segundo mensajero AMPc, y por consiguiente la relajación del músculo liso.
- *Carbacol*: Agonista de receptores muscarínicos de tipo M3 (perteneciente a la familia de proteínas G del subtipo G_q). Regulan positivamente a la fosfolipasa C y, por ende, a las vías de señalización del inositol trifosfato y del calcio intracelular. En el músculo liso, por lo general, causa la contracción del mismo debido a un aumento de calcio intracelular.

- *Forskolina*: Aunque presenta el mismo efecto que el isoproterenol y el salbutamol, la vía de actuación es distinta, ya que actúa directamente sobre la enzima adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc intracelulares, generando la relajación del músculo liso.

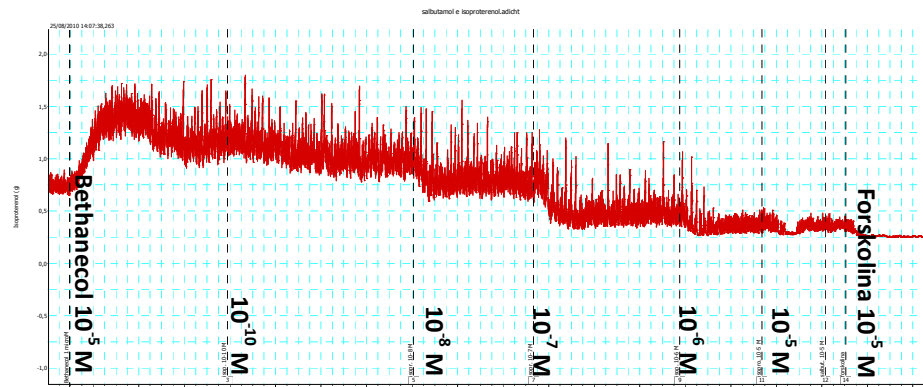


Figura 7: Registro de relajación de una tira de músculo sano a diferentes concentraciones de isoproterenol, desde 10^{-10} hasta 10^{-5} M

2.4. Curva dosis-respuesta de los fármacos

Se realizó una curva de dosis-respuesta acumulativa de los diferentes fármacos a las diferentes concentraciones, tomando como referencia la contracción máxima generada (contracción estable bethanecol–valor de la contracción de la forskolina) para cada uno de los fármacos. Se calculó mediante la fórmula

$$\% \text{ relajación/contracción (g): } (\text{contracción estable fármaco} - \text{valor contracción forskolina}) / \text{contracción máxima}$$

3. Aislamiento de las células troncales mesenquimales de tejido adiposo de rata

Se utilizó la grasa subcutánea de hembras SD. Se hizo una digestión mecánica de la misma lavándola, previamente, con PBS para quitar los restos de eritrocitos que pudieran quedar. Se retiró el PBS y se añadió un volumen de colagenasa al 0,075% durante una hora a 37°C y en agitación continua, previamente activada a 37°C durante media hora.

Para inactivar la colagenasa, se añadió un volumen de DMEM, se centrifugó a 300 g eliminando posteriormente tanto el sobrenadante como los restos de grasa, dejando únicamente el precipitado (fracción vascular estromal).

Se añadieron sobre el precipitado 5 ml de ficoll, y sobre éstos, 5 ml de DMEM. Se centrifugó durante 35 minutos a 300 g, recogiendo posteriormente únicamente la fase intermedia, la cual se lavó 3 veces con DMEM y se sembró en una placa de cultivos de 60 mm de diámetro con DMEM con 1g/l de glucosa y Glutamax, 10% suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina/estreptomicina (p/s) a 37°C con un 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días.

4. Caracterización de células troncales mesenquimales

En el 2006, el Comité de Células Madre Mesenquimales y de Tejido de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció una serie de características para caracterizar las MSCs^{70,71}.

- a. Deben de ser células que se adhieran en una superficie plástica.
- b. Deben expresar determinados marcadores de superficies como el CD90, CD44 y CD29 y carecer de CD11b y CD45 entre otros.
- c. Deben de tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Además, otro de los criterios que también hay que evaluar son las unidades formadoras de colonias con aspecto fibroblástico (CFU-Fs)

4.1. Diferenciación

Las ASCs se diferenciaron a diferentes estirpes celulares, tales como adipocitos y osteocitos, para comprobar la capacidad de diferenciación de éstas células.

4.1.1. Adipogénica

La característica principal de este tipo de diferenciación es la formación de vesículas lipídicas citoplasmáticas en las células que se diferencian, valorándose mediante la tinción de Oil Red O.

- Siembra y medio de diferenciación

Con el fin de valorar la capacidad de diferenciación adipogénica de estas células se realizó dicha diferenciación en los pases 4,6, 8 y 13.

Se sembraron 10.000 células/cm² en una placa de 12 pocillos. Se dejaron crecer hasta confluencia con medio de mantenimiento a 37°C con 5% de CO₂, sustituyéndolo por el medio de diferenciación (StemPro Adipogenesis differentiation Kit; Invitrogen) durante 3 semanas, cambiando el medio cada 3-4 días.

- Tinción con Oil Red O

El Oil Red O se une a las vesículas de lípidos que se van acumulando en el citoplasma de las células que se diferencian. Para teñir dichas vesículas, previamente se fijaron las células con PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.

La tinción se realizó mediante una solución de Oil Red O al 60% en d_4H_2O durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se observó al microscopio para su posterior valoración y obtención de fotos.

4.1.2. Osteogénica

Hay dos características fundamentales en este tipo de diferenciación. La primera es el incremento en la matriz de mineralizaron, observándose mediante la tinción de rojo alizarina y la segunda es el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual se valora mediante un ensayo colorimétrico el cual se basa en la hidrólisis del para-nitrofenilfosfato (pNpp) en para-nitrofenol (pNpol) catalizada por la fosfatasa alcalina.

- Siembra y medio de diferenciación

Con el fin de valorar la capacidad osteogénica de dichas células se realizó la diferenciación en los pases 3, 4, 8 y 13.

Se sembraron 3.000 células/cm² en una placa de 12 pocillos. Se dejaron una semana a 37°C y 5% de CO₂ con medio de mantenimiento. A la semana se pasó a medio de diferenciación (StemPro Osteogenesis differentiation Kit; Invitrogen) durante 4 semanas cambiándolo cada 3-4 días

- Tinción rojo alizarina

Se preparó una solución de rojo alizarina al 1% en d_4H_2O , se filtró por un filtro de 0,45 μm y se ajustó el pH a 4,2 con NH₃, guardándose a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se fijaron las células, después de 4 semanas de cultivo, con PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se añadió el colorante durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se observó al microscopio para su posterior valoración y obtención de fotos.

- Actividad fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina, enzima que cataliza la hidrólisis del pNpp en pNpol, se mide como: nmoles **de pNpol / mg proteína total**.

Durante 4 semanas se recogieron lisados celulares (1 vez por semana), tanto de las células que estaban con medio de diferenciación así como de células con medio de mantenimiento, utilizando Triton X-100 al 0,1% en d_4H_2O . El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C alicuotándolo en un volumen de 200 μ l guardándolo a -20°C hasta su uso.

Ensayo colorimétrico de pNpol

La reacción se realizó en un tampón de dietanolamina (Sigma) 1M, $MgCl_2$ 0,5 mM (Sigma) y 1,85 mg/ml pNpp (Sigma) a pH 9,8 durante 1 hora a 37°C. Se incluyó una curva patrón de pNpol, desde 30 a 1,25 nmoles, midiendo la absorbancia a 405 nm. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

Cuantificación de proteínas totales mediante el método Better-Bradford (Pierce).

Para medir la cantidad de proteínas totales, se hizo una curva estándar de albúmina desde 500 a 31,25 µg/ml.

Debido a que el Tritón X-100 de los lisados celulares interfiere con el Coomassie, se diluyeron las muestras celulares 1/5. Se leyó la absorbancia a 595 nm, haciendo todas las muestras por duplicado.

4.2. Citometría de flujo para marcadores de superficie

Otra de las maneras, internacionalmente establecidas, para caracterizar las ASCs es mediante citometría de flujo para marcadores de superficie^{70,71}. Como marcadores positivos se utilizaron CD29 (Biolegend), CD44 y CD90 (AbD Serotec), y como negativos CD11b y CD45 (AbD Serotec), usando para cada uno de ellos su isotipo control (Biolegend) (tabla 1). Entre 100.000 y 200.000 células se marcaron con 5 µl de anticuerpo, a 4°C durante 20 minutos y en oscuridad. Posteriormente se hizo un lavado con PBS para inactivar el anticuerpo y se resuspendieron en un volumen final de 400 µl de PBS. Una vez encontrada la población de interés, según su tamaño y complejidad, se seleccionó la región de interés sometiéndose a estudio 10.000 eventos. Se utilizó un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson (BD)) y los datos fueron analizados con el programa CellQuest Pro (BD)

Anticuerpo	Inmunotipo	Fluoróforo	Isotipo	Isotipo control
CD29	Monoclonal	PE	Hámster armenio IgG	PE-hámster armenio IgG1
CD44	Monoclonal	FITC	Mouse IgG1	FITC- mouse IgG1
CD90	Monoclonal	FITC	Mouse IgG1	
CD11b	Monoclonal	PE	Mouse IgG1	PE-mouse IgG1 _k
CD45	Monoclonal	PE	Mouse IgG2a	PE-mouse IgG2a

Tabla 1: Características de los anticuerpos utilizados en la caracterización de las ASCs por citometría de flujo.

4.3. Unidades formadoras de colonias de aspecto fibroblástico (CFU-Fs)

Se sembraron 100 células en una placa de 100 mm de diámetro con medio de mantenimiento durante 15 días cambiando cada 3-4 días el medio de cultivo. Al cabo de los 15 días, las células se fijaron con PFA al 4% y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,1% en dH_2O .

4.4. Tiempo de duplicación

Se sembraron 2.000 células/cm² en placa de 100 mm de diámetro, con medio de mantenimiento. Una vez que las células habían llegado a confluencia se levantaron con tripsina/EDTA, realizando un conteo con cámara de Neubauer. Para calcular el tiempo de duplicación en cada uno de los pases, se aplicó la siguiente fórmula⁷².

$$TD = \frac{T}{\frac{\log_{10} N_f - \log_{10} N_i}{\log_{10} 2}}$$

Siendo **TD**: Tiempo de duplicación; **T**: tiempo (horas) de las células en cultivo; **N_f**: Número de células en confluencia y **N_i**: Número de células sembradas.

5. Diferenciación miogénica

En 2001, Zuk y col.⁷³ propusieron un protocolo de diferenciación a células de músculo estriado utilizando ASCs humanas. El medio de diferenciación miogénico estaba compuesto por **DMEM, 10% de SFB, 1% p/s, 5% suero de caballo (HS), 50 µM hidrocortisona (HC) y 0,1µM dexametasona (dexa), durante 6 semanas a 37°C y 5% de CO₂**, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. En 2002^{74,75} se publicaron otros artículos en los que se suprimía la dexa, asegurando que la clave de la diferenciación estaba en la HC. Ya que había diferencias, con respecto al origen de las ASCs, entre el presente trabajo y los citados anteriormente, se decidió analizar si la presencia o ausencia de dexa era relevante en el proceso de diferenciación, haciendo un estudio de expresión tanto de marcadores de músculo liso como de estriado, mediante técnicas de RT-PCR, qPCR así como inmunocitoquímica para cald1, smnt y Myh2.

5.1. Siembra y cultivo

Se sembraron 1.000 células/cm² en una placa de 6 pocillos con medio de mantenimiento a 37°C y con un 5% de CO₂ durante una semana. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

Al cabo de los 7 días, se pasó a medio de diferenciación miogénico durante 6 semanas, cambiando el medio cada 3-4 días.

5.2. RT-PCR

Se hizo la extracción de ARN total a la semana, 3 y 6 semanas de diferenciación, con trizol (Invitrogen). La cantidad y pureza del ARN extraído se midió en Nanodrop (NanoDrop Technologies, Inc, DE, USA). Para valorar la integridad del ARN extraído, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 90 V durante media hora, tiñendo los fragmentos con bromuro de etidio a una dilución 1/10.000 y visualizando la imagen en un fotodocumentador digital Gel PrinterPlus.

Posteriormente, 5 µg de ARN total fueron tratados con la enzima Turbo DNAsa de AMBION (Austin, TX, USA) eliminando de esta manera los posibles restos de ADN genómico que pudieran interferir con los ensayos posteriores, volviéndose a medir la concentración (ng/µl) y la pureza del ARN ($A_{260/280}$).

Se utilizaron 600 ng. aproximadamente de ARN, tratados con DNAsa, para realizar la retrotranscripción (RT), mediante el kit AMV de Invitrogen.

Como control positivo de la expresión de marcadores de músculo liso se utilizaron células de músculo liso vascular de ratón y como control positivo de expresión de marcadores de músculo esquelético se empleó músculo estriado procedente del gastrocnemio de una rata de 5 semanas.

5.2.1. Diseño de oligos

Se escogió un panel de 8 marcadores moleculares, 3 de músculo esquelético (MyoD1, Myf6 y MYH2), 4 de músculo liso (Cald1, MYH11, α -actina y Smnt) y como control de expresión endógena se utilizó β -actina.

Se buscaron en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) las secuencias de interés utilizando la opción Pick Primers teniendo en cuenta los siguientes parámetros: a) que fueran primers específicos de las secuencias a estudiar, b) que hubiera un intrón entre los extremos del primer, c) que el tamaño de los primers fuera entre 20-22 pb y d) que las temperaturas de “melting” estuvieran entre 55°C y 70°C (tabla 2).

Primer	Secuencia (5'-3')	Tm	Nº de entrada NCBI
β-actina FW	AGA GGG AAA TCG TGC GTG	62	NM_001101.3
β-actina RV	CTG GGT ACA TGG TGG TGC	56	
MyoD1 FW	GGG AAG AGT GCG GCC GTG TC	67	NM_176079.1
MyoD1 RV	GGG AGA CGG GGT CTG GGT CC	69	
MYH2 FW	AGC AGG AGC GAC CCT GAC GG	67	NM_001135157.1
MYH2 RV	CCA CGG TAG GCA GCC ACC AC	67	
Myf6 FW	GCC CGC AGT GGC CAA GTG TT	65	NM_0131721
Myf6 RV	AAG GGT CAC GTG ATC ATA GCA AAA GTT	65	
Smnt FW	CGG TCT CAC TGC ATC TGC CCG G	70	NM_001013049.2
Smnt RV	AAC GGA TCC GCC GCC GTT CT	65	
Cald1 FW	GCG CCA GGT CCC CTA CCT CA	67	NM_013146.2
Cald1 RV	CCG CAG CCT TTC CTG TCG GG	67	
MYH11 FW	CCC AAT GGC CCA GGC CGA C	66	NM_001170600.1
MYH11 RV	GCTC CCC CGT GAT GCT GCT G	67	
α-actina FW	GCC CAG CCA GTC GCC ATC AG	67	NM_031004.2
α-actina RV	GGC CTT AGG GTT CAG CGG CG	67	

Tabla 2: Secuencia de las parejas de primer específicos de la especie *Rattus norvegicus*, obtenidos de la base de datos NCBI para los genes β-actina, MyoD1, MYH2, Myf6, Cald1, α-actina, MYH11 y Smnt, las temperaturas de “melting” correspondientes para cada uno de los primers y así como el número de entrada al NCBI.

5.2.2. Condiciones de la PCR

Todas las PCRs se realizaron en el termociclador GemAmp PCR System 9700 de Applied Biosystem.

La PCR comenzó con un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 1 minuto a la Tm correspondiente (específica para cada pareja de primers (tabla 2)) y una extensión a 72°C durante 1 minuto, acabando con una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1,5% durante 30 minutos a 90 V, tiñendo los fragmentos de ADN con bromuro de etidio y registrando la imagen en un fotodocumentador digital Gel PrinterPlus.

5.3. PCR a tiempo real

Todas las reacciones de qPCR se desarrollaron en el Light Cyclor 1.5 (Roche), con un kit comercial de amplificación para sondas de hidrólisis (LightCycler Taqman Master, Roche), conteniendo FastStart TaqDNA polimerasa. Las secuencias de los primers y de las sondas de hidrólisis correspondientes, se eligieron con la aplicación Real Time Ready configurator (Roche). Las sondas de hidrólisis están marcadas con el fluoróforo fluoresceína (FAM) y se eligieron de entre la Universal Probe Library (Roche).

5.3.1. *Condiciones de la PCR*

Las condiciones de programación del Light Cyclor consistieron, en todos los casos, en 10 minutos a 95°C seguidos de 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 segundo, con una rampa final de enfriamiento o cooling hasta los 40°C con un descenso de 20°C por segundo. El canal de emisión de fluorescencia fue a 487 nm, la cual se detectó en el paso a 72°C.

5.3.2. *Medida de cuantificación*

La expresión relativa de dichos genes se calculó mediante el método comparativo $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Este método es usado para medir las veces que un gen se expresa de más o de menos respecto de una muestra control⁷⁶.

Se hicieron diluciones seriadas de todos los ADNc (diluciones 1/10 desde la muestra más concentrada de ADNc hasta una dilución 1/10.000) para encontrar el rango en el cual la pendiente de la recta fuera la más cercana a -3.32

(pendientes entre -3.1 y -3.5), lo que implica una eficacia en la reacción de polimerización entre el 90 y el 110%.

En todos los casos se utilizó como gen endógeno la β -actina y como comparador, la expresión de dichos marcadores en las células no tratadas.

5.4. Inmunocitoquímica

En placas de 6 pocillos se colocaron 4 cubres de vidrio de 10 mm de diámetro sobre los cuales se sembraron 10.000 células/cm². Se mantuvieron durante una semana con medio de mantenimiento, para después mantenerlos durante 6 semanas con medio de diferenciación miogénico.

Al cabo de 6 semanas, se fijaron con PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se permeabilizó la membrana con Tritón X-100 al 0,5% en TBS, para después inhibir la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0,5% en metanol.

Para suprimir la autofluorescencia de las células se utilizó borohidruro de sodio durante 10 minutos. Como bloqueo se utilizó 5% de HS, 0,05% de Triton X-100 en TBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo 1/10, con las siguientes concentraciones: Cald1 (mouse IgG1, Sigma) 1/500, Smnt (mouse IgG1, Bionova) 1/100 y Myh2 (mouse IgG1, Sigma) 1/400, durante toda la noche en oscuridad y a 4°C.

Transcurridas las 24 horas de incubación del anticuerpo primario, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario, Alexa fluor 555 donkey anti-mouse (Invitrogen) a una dilución 1/100 en solución de bloqueo 1/10 durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Por último, se montaron las muestras con medio de montaje con DAPI (Invitrogen) y se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B. El programa de obtención de imágenes fue LAS AF de Leica.

6. Transducción de ASCs con un lentivirus para GFP

Para poder hacer el seguimiento *in vivo* de las ASCs, éstas se transdujeron con un lentivirus que induce la expresión constitutiva de una proteína verde fluorescente (GFP), cedido por el profesor Luigi Naldini del Telethon Institute para la terapia génica de la Fundación San Raffaele del Monte Tabor (Milán) y producido por el Doctor Guillermo Guenetxea, de la división de Hematopoyesis del CIEMAT (Madrid). Las ASCs, en pase 2, se sembraron en subconfluencia en placas de 100 mm de diámetro añadiendo a las 24 horas el lentivirus hPGK-GFP a una multiplicidad de infección de 11, incubando 24 horas más el cultivo a 37°C y un 5% de CO₂, tras las cuales se cambió el medio, siguiendo el cultivo de manera estándar.

Para comprobar que las características de las ASCs no se habían visto alteradas por la transducción con el lentivirus, se hizo diferenciación osteogénica y adipogénica, CFU-Fs, además de analizar por citometría de flujo los diferentes marcadores de superficie. Como marcadores positivos se utilizaron CD90 y CD29 y como negativos CD11b y CD45 (AbD Serotec) comparando cada uno de ellos con su isotipo control (Biolegend), utilizando anticuerpos conjugados con fluoróforos que no interfiriesen con la fluorescencia de la GFP (Alexa flúor-647)(tabla 3). También se estudió la expresión de los marcadores miogénicos analizados previamente (epígrafe 5.3 de Material y Métodos), comprobando de esta manera que el patrón de expresión de dichos marcadores no se ha visto alterado respecto de las no transducidas.

Anticuerpo	Inmunotipo	Fluoróforo	Isotipo	Isotipo control
CD29	Monoclonal	Alexa flúor 647	Hámster armenio IgG	Alexa flúor 647 - hámster armenio IgG
CD90	Monoclonal		Mouse IgG1	Alexa flúor 647 - mouse IgG1
CD11b	Monoclonal		Mouse IgG1	
CD45	Monoclonal		Mouse IgG2a	Alexa flúor 647 - mouse IgG2a

Tabla 3: Características de los anticuerpos utilizados en la caracterización de las ASCs-GFP por citometría de flujo.

7. Terapia celular: efecto de las células troncales mesenquimales en el tejido dañado

Un millón de ASCs-GFP, con fenotipo miogénico o en proliferación, se inyectaron en los animales inmediatamente después de haber realizado la sección de ambos esfínteres a un lado de la herida, resuspendidas en 30 µl de suero salino con una jeringa Hamilton con aguja 30G.

Para valorar el efecto de las diferentes ASCs en la regeneración del tejido así como en la capacidad contráctil del mismo, se realizaron diferentes estudios, transcurridos 4 días, 1 semana y 4 semanas después del daño.

7.1. Se realizó un **estudio histológico**, mediante tinciones de hematoxilina/eosina así como de tricrómico de Masson en secciones de tejidos congelados en OCT.

7.2. Para localizar las ASCs-GFP inyectadas, los cortes, previamente fijados en acetona durante 20 minutos a -20°C, fueron montados con medio de montaje con DAPI y visualizados en el **microscopio de fluorescencia**.

7.3. Se repitió el estudio de **baño de órganos**, realizando el mismo proceso descrito previamente (epígrafe 2 de Material y Métodos), comparando la capacidad tanto de contracción como de relajación del tejido muscular con ASCs respecto de las muestras dañadas como no dañadas.

7.4. Se quiso analizar si dichas células, *in vivo*, tenían la capacidad de dividirse. Para ello se hizo una inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular Ki-67 (mouse IgG1, Novocastra)

7.4.1. Inmunohistoquímica de Ki-67

Tras fijar el tejido con acetona durante 20 minutos a -20°C, se hizo un desenmascaramiento del tejido con citrato sódico durante 20 minutos a 90°C. Se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0,5% en metanol. Como solución de bloqueo se utilizó TBS-Triton con un 1,5% de BSA y un 5% de HS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se diluyó 1/100 en solución de bloqueo 1/10, dejándolo toda la noche en oscuridad y a 4°C. Trascurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se añadió el anticuerpo secundario biotinilado, biotin-XX goat anti-mouse IgG (Invitrogen), a una dilución de 1/500 en solución de bloqueo 1/10 durante una hora a temperatura ambiente.

Para revelar el anticuerpo 2º se utilizó un kit ABC (ABC Staining System, Santa Cruz) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para dar color a la reacción se añadió DAB (Dako) durante un máximo de 15 minutos a temperatura ambiente. Se hizo un contraste con hematoxilina y se montaron las preparaciones con DPX. Se tomaron imágenes con el programa Image Pro Plus.

7.5. Estudio de quimioquinas SDF-1 y MCP-3 en el tejido del esfínter anal sano, dañado y con ASCs a diferentes tiempos y expresión de receptores específicos de SDF-1 y MCP-3 en las ASCs con fenotipo miogénico y en proliferación.

Baek y col.³⁸ publicaron recientemente que tras un daño en el EA, en un modelo de rata, aumentaba la expresión de dos quimioquinas, *Stromal derived factor-1* (SDF-1) y *Monocyte chemotactic protein-3* (MCP-3).

De este modo, se quiso comparar la expresión de estas dos quimioquinas en tejidos dañados y con ASCs, tanto en proliferación como con fenotipo miogénico, a los 4 días, 1 semana y un mes, respecto de tejidos sanos mediante PCR a tiempo final.

También se estudió el patrón de expresión de los receptores específicos de cada quimioquina (CCR1 y CCR2 para MCP-3 y CXCR4 para SDF-1)^{38,77} en las células sometidas a diferenciación miogénica a diferentes tiempos (1, 3 y 6 semanas con y sin dexametasona) así como en las no tratadas con dicho medio de diferenciación.

Todas las muestras, tanto en el estudio de quimioquinas como de sus receptores, se hicieron por duplicado.

7.5.1.1. Extracción del tejido y tiempos de estudio

Se extrajo el canal anal transcurridos 4 días, 1 semana y un mes tras el daño a animales a los que se les había realizado únicamente el daño así como a aquellos en los que se habían inyectado ASCs, congelándolos inmediatamente en nitrógeno líquido y guardándolos a -80°C hasta su uso.

7.5.1.2. RT-PCR

La extracción de ARN, así como el tratamiento de DNasa y RT se realizaron de la misma manera anteriormente descrita (epígrafe 5.2 de Material y Métodos).

7.5.1.3. Diseño de oligos

Se buscaron las secuencias de interés en la base de datos NCBI eligiendo oligonucleótidos con las mismas características y restricciones que con las secuencias para los marcadores de diferenciación miogénica (epígrafe 5.2.1 de Material y Métodos). Como control de expresión, de nuevo, se utilizó la β -actina (tabla 4)

Primer	Secuencia (5'-3')	Tm	Nº de entrada NCBI
CCR1 FW	CCA CTG GTG AGC ACT GTG ATG C	66	NM_020542.2
CCR1 RV	GAG TCC AGC CCC GAA GGC TCT	67	
CCR2 FW	GAG GGG GCC ACC ACA CCG TA	65	NM_021866.1
CCR2 RV	GGC AAA CAC AGC CAC CAC CCA	67	
CXCR4 FW	CCA GGG TGG AGA GCG AGC AT	67	NM_022205.3
CXCR4 RV	GGA GGT CAG CCA CGG ACA GGT	67	
MCP-3 FW	GCC GCG CTT CTG TGT GTG CT	65	NM_001007612.1
MCP-3 RV	ACA AAG TCA ATG GGG CGG GGG	65	
SDF-1 FW	GCC AAG GTC GTC GCT GTG CT	65	AF_209976.1
SDF-1 RV	CTC CCC AGG GCT CCC AGC AA	67	

Tabla 4: Secuencia de los primers específicos de la especie *Rattus norvegicus*, temperatura de melting de cada uno de ellos, así como los números de entradas al NCBI para los genes CCR1, CCR2, CXCR4, MCP-3 y SDF-1.

7.5.1.3.1. Condiciones de la PCR

La PCR comenzó con un primer paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguidos de **40 ciclos** de 94°C durante 1 minuto, 1 minuto a la T_m correspondiente (específica para cada pareja de primers) y una extensión a 72°C durante 1 minuto, acabando con una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1,5% durante 30 minutos a 90 V, con tinción con bromuro de etidio.

8. Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente los resultados, se realizó un análisis de la varianza con el programa Statgraphics Centurion XVI. *P-valores* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

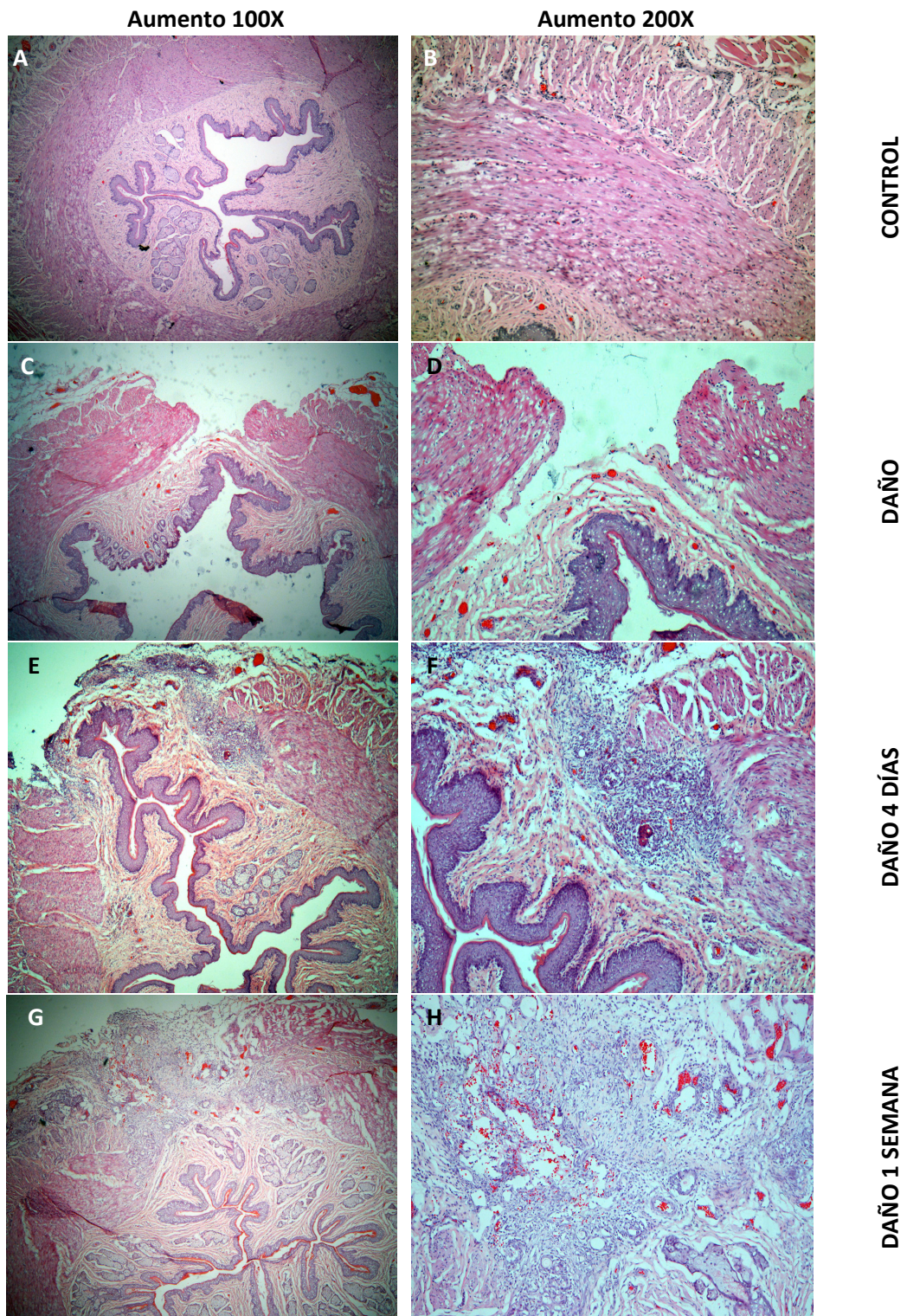
Resultados

“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela (A. Einstein)”

1. Modelo animal de incontinencia anal: estudio histológico del daño en el esfínter

Tras 4 días, 1 y 4 semanas del daño, se extrajo el canal anal y se congeló en OCT, realizando cortes a 5 μ m, haciendo tinciones de hematoxilina/eosina así como tricrómico de Masson para poder evaluar el daño realizado. Se comprobó que la mucosa no se había seccionado tras el daño (figura 8C y D). Tras 4 días de haber realizado el daño (figura 8E) se pudo observar que la mucosa se había herniado debido al corte producido en la capa muscular, además de encontrar infiltrado linfocitario alrededor de la herida (figura 8F)

La zona donde se había realizado el daño, tras una semana (figura 8G y H), empezaba a cicatrizar, encontrándose todavía infiltrado linfocitario, aunque en menor medida que en el caso anterior. Transcurridas 4 semanas, se encontró una cicatriz en el tejido, generada por la herniación de la mucosa (figura 8I y J). Al realizar una tinción de Masson se pudo comprobar que la reparación, aparentemente sufrida por el tejido, consistía en una fibrosis de la zona y no en la regeneración del músculo en sí (figura 8K y L).



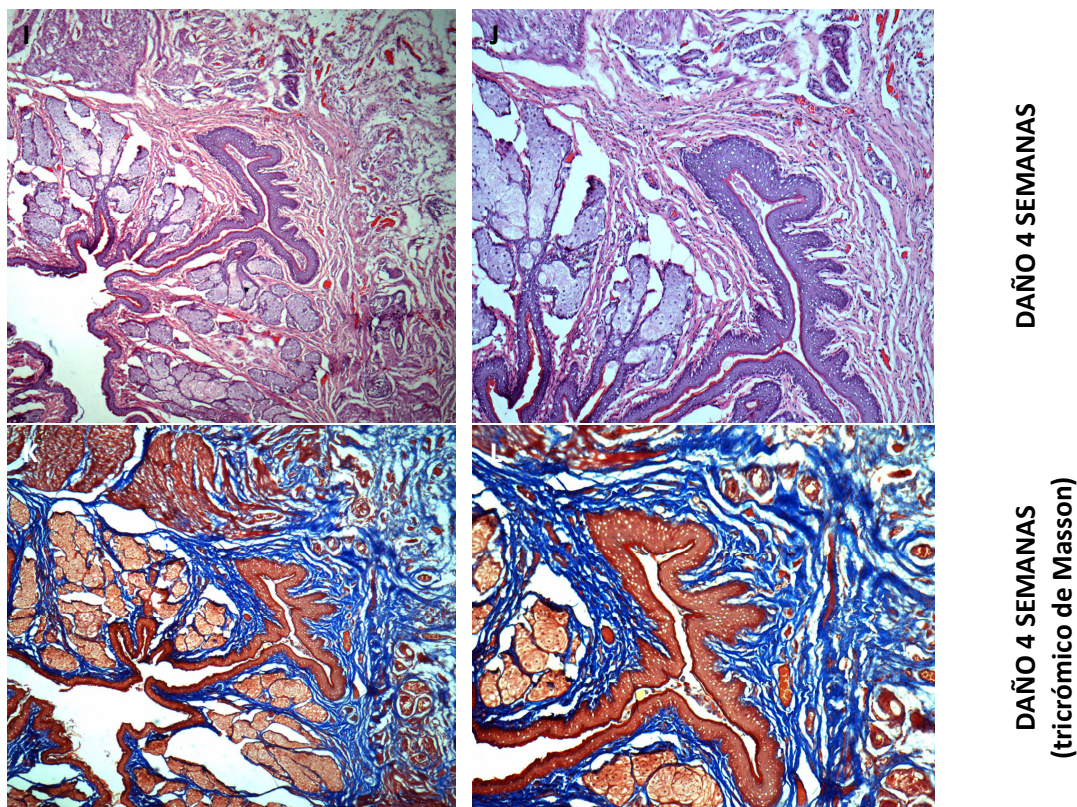


Figura 8: Estudio histológico durante 4 semanas del daño en el esfínter mediante tinción de hematoxilina/eosina (imágenes A-J) así como por tinción de tricrómico de Masson (imágenes K y L). Imágenes A, C, E, G e I: Imágenes de la tinción de hematoxilina/eosina tomadas a un aumento de 100X de la zona de daño; Imágenes B, D, F, H y J: imágenes tomadas a un aumento 200X de la tinción hematoxilina/eosina del daño. Imágenes A y B: Muestra control, sin dañar; Imagen C y D: Daño realizado; Imágenes E y F: Daño tras 4 días; Imágenes G y H: Una semana de evolución del daño; Imágenes I y J: 4 semanas de evolución del daño. Imagen K: Tinción tricrómico de Masson del daño a un aumento del 100X transcurridas 4 semanas; Imagen L: Tricrómico de Masson aumento 200X de la zona de daño a las 4 semanas.

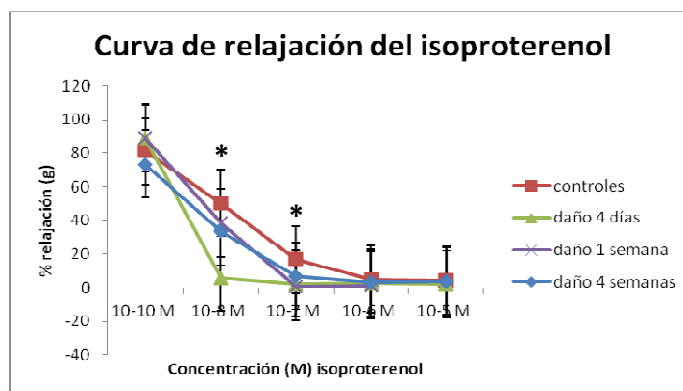
2. Baño de órganos

Tras extraer el canal, se transfirió a una solución de Krebs atemperado a 37°C durante 90 minutos, transcurridos los cuales se aplicó una tensión basal entre 0,6-0,7 g. Se estudió la contractibilidad del músculo sano, así como de tejidos dañados a los 4 días, 1 y 4 semanas. Se hizo un estudio dosis-dependiente de relajación muscular generada por isoproterenol y salbutamol y un estudio de contracción muscular por carbacol, observando que la relajación generada por el isoproterenol en las muestras control (gráfica 1) es mucho más rápida y acusada que la obtenida por el salbutamol (gráfica 2).

La curva dosis-respuesta del carbacol reveló que la contracción máxima se obtenía a una concentración de 10^{-6} M (gráfica 3).

2.1. Isoproterenol

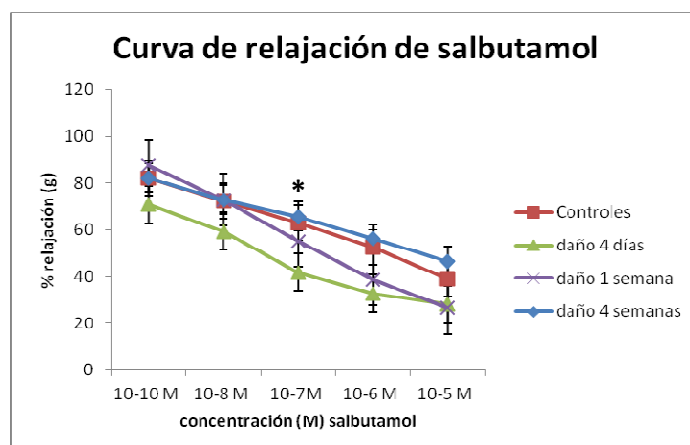
Tras 4 días de daño, a una dosis de 10^{-8} M de isoproterenol, el tejido dañado se comportaba como los tejidos sanos a dosis de 10^{-6} M, lo que implica que los tejidos tras 4 días del daño son menos capaces de mantener el tono muscular, para la misma concentración de isoproterenol, respecto de los controles. Después de 1 y 4 semanas del daño, se obtuvieron valores muy similares a los obtenidos en las muestras control, no observándose diferencias claras entre los tejidos dañados y no dañados (gráfica 1).



Gráfica 1: Comparación de las curvas de relajación producidas por isoproterenol en el tejido dañado a los 4 días (gráfica en verde), 1 semana (gráfica morada) y 4 semanas (gráfica azul) respecto del tejido control (gráfica en marrón). Eje X: concentración (M) de isoproterenol; Eje Y: % relajación del tejido (en gramos) para una concentración dada de isoproterenol. Asterisco: Indica diferencias significativas entre los valores de relajación para las concentraciones 10^{-8} y 10^{-7} M entre la muestra control y la dañada a los 4 días. El % de relajación, para cada tiempo de estudio, es expresado como la media de 3 individuos \pm error estándar

2.2. Salbutamol

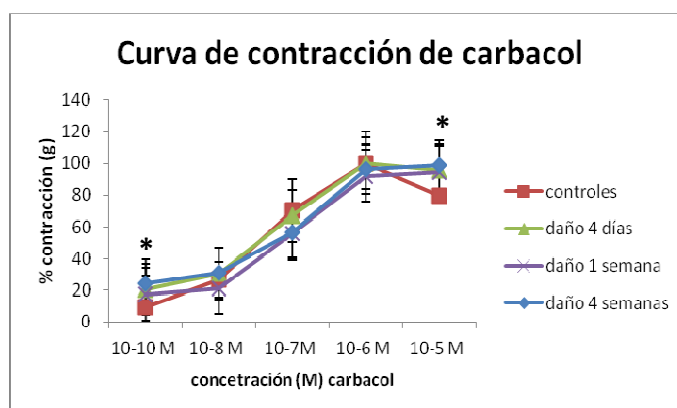
A los 4 días del daño, se observó un descenso en todos los valores de relajación del tejido dañado respecto del control, encontrándose diferencias significativas únicamente a una concentración de 10^{-7} M entre los controles y los tejidos dañados a los 4 días. Dichos valores, tras una semana del daño se recuperaron ligeramente, aunque la diferencia entre la muestra control y la dañada, a una concentración de 10^{-7} M, se mantuvo. Al cabo de 4 semanas, no había diferencias entre las muestras dañadas y los controles (gráfica 2).



Gráfica 2: Comparación de las curvas de relajación producidas por salbutamol en el tejido dañado a los 4 días (gráfica en verde), 1 semana (gráfica en morado) y 4 semanas (gráfica en azul), respecto de la control (gráfica en marrón). Eje X: concentración (M) de salbutamol; Eje Y: % relajación del tejido (en gramos) para una concentración dada de salbutamol. Asterisco: Indica diferencias significativas entre los valores de relajación para la concentración 10^{-7} M entre la muestra control y las dañadas a los 4 días y a la semana. El % de relajación, para cada tiempo de estudio, es expresado como la media de 3 individuos \pm error estándar

2.3. Carbacol

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre valores de contracción de tejidos dañados a las 4 semanas respecto de los controles para una concentración de 10^{-10} M y entre los controles y los dañados a los 4 días y a las 4 semanas a 10^{-5} M. El valor máximo de contracción se mantuvo en todos los tiempos, siendo 10^{-6} M, al igual que en las muestras control (gráfica 3)



Gráfica 3: Comparación de las curvas de contracción producidas por carbacol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en verde), a la semana (gráfica en morado) y a las 4 semanas (gráfica en azul) respecto de la obtenida para tejidos control (gráfica en marrón). Eje X: concentración (M) de carbacol; Eje Y: % contracción del tejido (en gramos) para una concentración dada de carbacol. Asterisco: Indica diferencias significativas entre los valores de contracción para la concentración de 10^{-10} M entre la muestra control y la dañada a las 4 semanas y para la concentración 10^{-5} M entre la muestra control y las dañadas a los 4 días y 4 semanas. El % de contracción, para cada tiempo de estudio, es expresado como la media de 3 individuos \pm error estándar

3. Caracterización de las células troncales mesenquimales

3.1. Diferenciaciones

3.1.1. Adipogénica

Tras 3 semanas en cultivo con medio de diferenciación, se realizó una tinción con Oil Red O, el cual se une a las vesículas de grasa acumuladas en el citoplasma de las células diferenciadas. Se observaron dichas vesículas en los pases 4 y 6 en ASCs tratadas con medio de diferenciación (figura 9B y D) mientras que las que no habían sido sometidas a diferenciación no las presentaban (figura 9A y C).

En los pases 8 y 13, las ASCs con medio de diferenciación adipogénico no presentaban acúmulos de grasa en el citoplasma (figura 9F y H) al igual que aquellas que habían sido cultivadas con medio de mantenimiento (figura 9E y G).

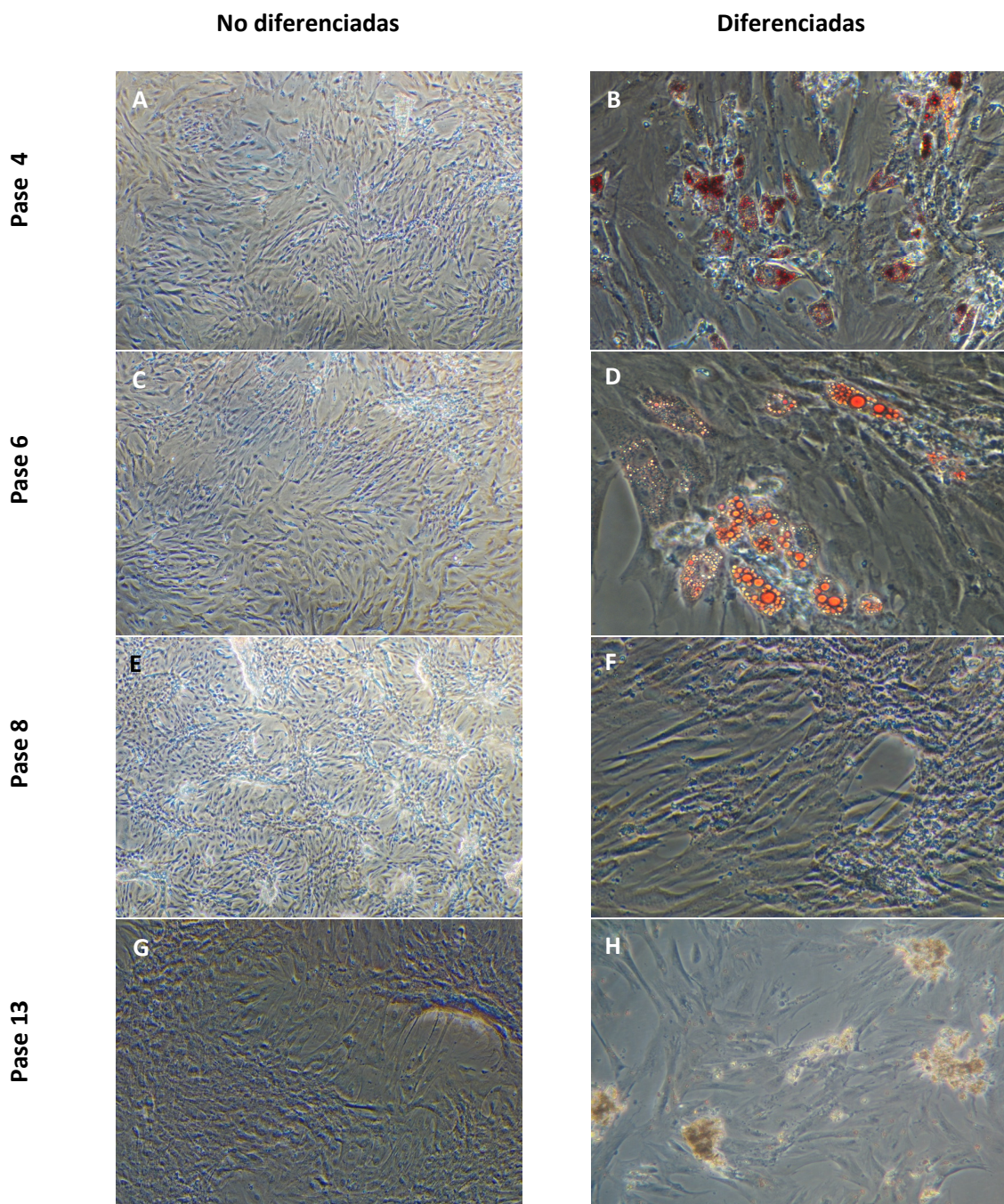


Figura 9: Tinción Oil Red O de ASCs diferenciadas y no diferenciadas a adipocitos. Imágenes A, C, E y G: Tinción Oil red O de ASCs controles a los 7 días de cultivo (aumento del 40X). Imágenes B, D, F y H: Tinción Oil red O de ASCs sometidas a diferenciación adipogénica a los 21 días del tratamiento (aumento de 100X). Imágenes A y B: ASCs en pase 4, Imágenes C y D: ASCs en pase 6; Imágenes E y F: ASCs en pase 8; Imágenes G y H: ASCs en pase 13 (aumento de 100X). En las imágenes B y D se observan vesículas de grasa teñidas con Oil red O, indicativo de diferenciación adipogénica respecto de sus controles. Sin embargo en los pases 8 y 13, no se observaron células diferenciadas (imágenes F y H).

3.1.2.Osteogénica

3.1.2.1. Tinción rojo alizarina

Tras 4 semanas de cultivo con medio de diferenciación, se realizó una tinción con rojo alizarina para visualizar los depósitos de calcio generados por las ASCs diferenciadas. Éstos se observaron en los pases 3, 4, 8 y 13 en ASCs tratadas con medio de diferenciación (figura 10B, D, F y H) mientras que aquellas que no habían sido sometidas a diferenciación, para los pases 3, 4 y 8 no los presentaban (figura 10A, C, E). Sin embargo, ASCs en proliferación en pase 13 con medio de mantenimiento presentaron cierta diferenciación espontánea a osteocitos, debido a la presencia de depósitos de calcio revelados por la tinción (figura 10G).

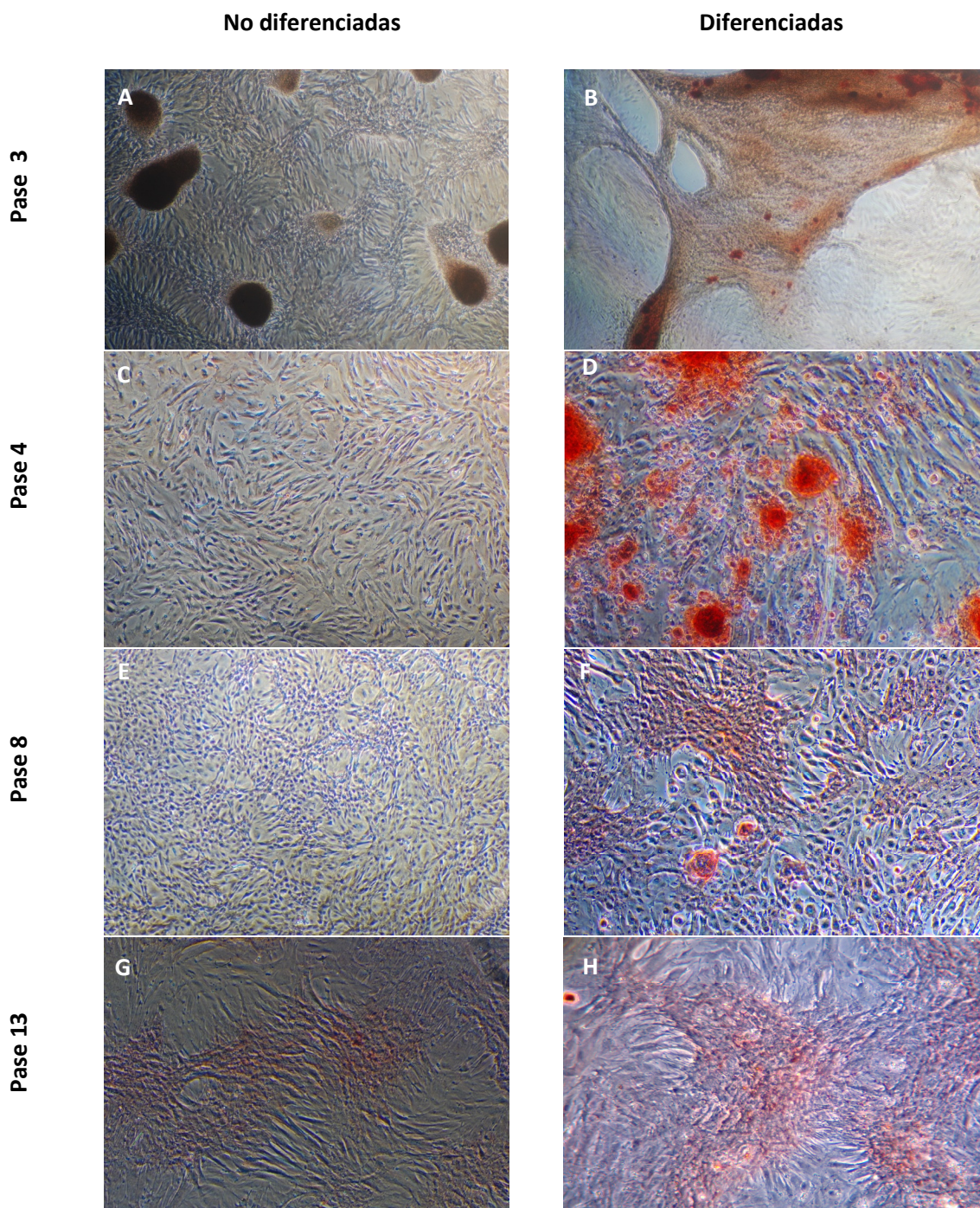
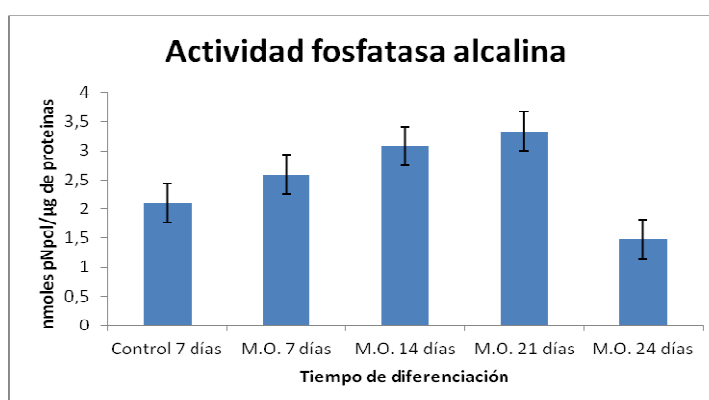


Figura 10: Tinción rojo alizarina de ASCs diferenciadas y no diferenciadas a osteocitos. Imágenes A, C, E y G: Tinción rojo alizarina de ASCs controles a los 7 días de cultivo (aumento del 40X). Imágenes B, D, F y H: Tinción rojo alizarina de ASCs sometidas a diferenciación osteogénica a los 28 días del tratamiento (aumento 100X). Imágenes A y B: ASCs en pase 3, Imágenes C y D: ASCs en pase 4; Imágenes E y F: ASCs en pase 8; Imágenes G y H: ASCs en pase 13 (aumento de 100X). En las imágenes B, D, F y H se observan zonas teñidas de rojo, indicativo de depósitos de calcio debidos a la diferenciación osteogénica respecto de sus controles. Sin embargo en el pase 13, se observaron dichos depósitos en cultivos de ASCs con medio de mantenimiento (imagen G).

3.1.2.2. Ensayo colorimétrico

El ensayo de la fosfatasa alcalina realizado con ASCs en pase 3 (gráfica 4), mostró un incremento en la concentración de pNpp a medida que iban aumentando los días en cultivo con medio de diferenciación osteogénico, alcanzando la máxima concentración a los 21 días de iniciar la diferenciación, para finalmente disminuir a los 24 días de tratamiento.



Gráfica 4: Actividad fosfatasa alcalina de ASCs diferenciadas a osteocitos en pase 3. Controles 7 días: ASCs en proliferación a los 7 días de cultivo; M.O.7 días: ASCs con medio de diferenciación osteogénico durante 7 días; M.O.14 días: ASCs con medio de diferenciación osteogénico durante 14 días; M.O.21 días: ASCs con medio de diferenciación osteogénico durante 21 días; M.O.24 días: ASCs con medio de diferenciación osteogénico durante 24 días.

3.2. Citometría de flujo para marcadores de superficie

Se caracterizaron las ASCs mediante citometría de flujo a lo largo de 13 pases (tabla 5). En todos los pases se observó un porcentaje muy parecido para cada marcador, siendo un 99,98% de células positivas para CD29, 93,39% para CD44 y 99,84% para CD90, mientras que para los marcadores CD11b y CD45 se obtuvieron un 100% de células negativas respectivamente.

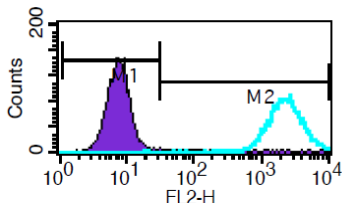
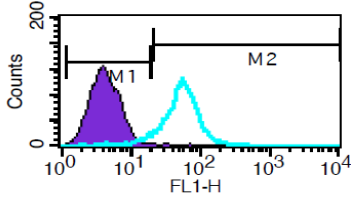
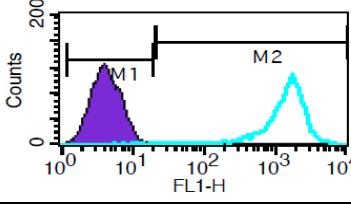
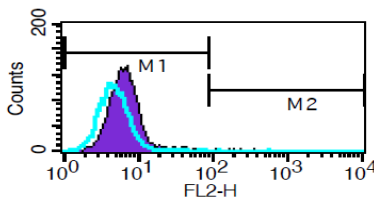
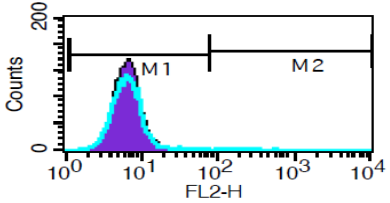
Marcadores positivos	Histograma	% células positivas
CD29-PE		99,98%
CD 44-FITC		93,39%
CD 90-FITC		99,84%
Marcadores negativos	Histograma	% células negativas
CD 11b-PE		100%
CD 45-PE		100%

Tabla 5: Marcadores de superficie para ASCs en fase 9. Población con más de un 90 % de ASCs positivas para CD29, CD44 y CD90 y un 100 % de células negativas para CD11b y CD45. Eje X del histograma: Intensidad de fluorescencia para un anticuerpo dado. Eje Y del histograma: Número de eventos analizados en cada muestra. M1: región del histograma negativa para un anticuerpo dado; M2: región del histograma positiva para un anticuerpo dado. Histograma morado: ASCs marcadas con el isotipo control. Histograma azul: ASCs marcadas con el anticuerpo en concreto que se quiere estudiar.

3.3. Unidades formadores de colonias con aspecto fibroblástico (CFU-Fs)

Tras 15 días de cultivo, con medio de mantenimiento, las ASCs se tiñeron con cristal violeta al 0,1%. Se observaron pequeñas colonias en la placa (figura 11A), tomándose imágenes con aumento, observando una morfología (figura 11B) muy parecida a la de los fibroblastos.

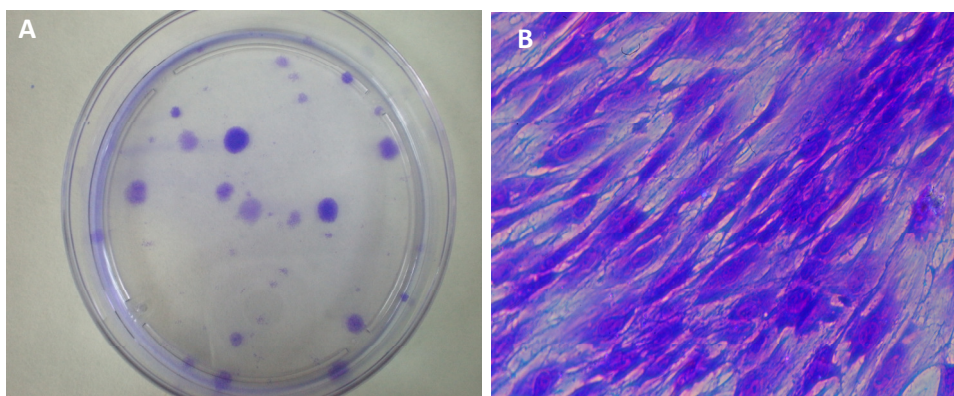
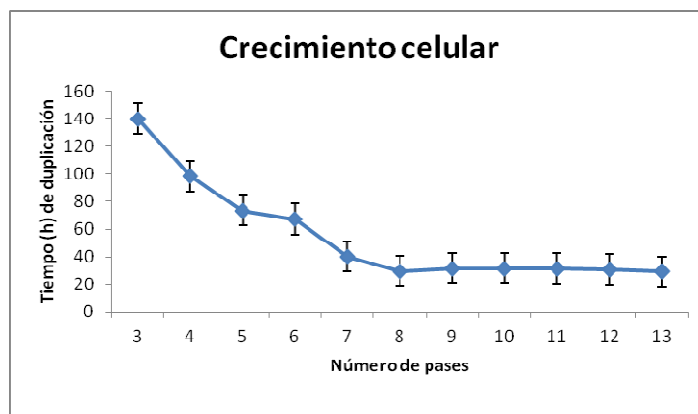


Figura 11: CFU-Fs de ASCs en pase 4. Imagen A: colonias de ASCs en pase 4 teñidas con cristal violeta al 0,1%; Imagen B: Aumento 100X de una colonia teñida con cristal violeta.

3.4. Tiempo de duplicación

Se calculó el tiempo de duplicación del cultivo para cada pase, durante 13 pases. Los datos obtenidos mostraron que a pases bajos, el tiempo de duplicación era muy alto, llegando a ser casi 140 horas en el pase 3 (gráfica 5). A medida que se incrementaba el número de pases, el tiempo de duplicación iba disminuyendo, llegando a ser, de media, unas 30 horas a partir del pase 8.



Gráfica 5: Evolución del crecimiento celular de las ASCs a lo largo de 13 pases. Eje X: Número de pases estudiados; Eje Y: Tiempo de duplicación (en horas).

4. Diferenciación miogénica de ASCs

4.1. Cultivo celular

Según artículos publicados^{73,75}, las células sufren ciertos cambios morfológicos al irse diferenciando; éstas van adquiriendo una morfología que recuerda a la de “valles y montañas”. A lo largo de las 6 semanas de diferenciación, se fueron tomando imágenes, observando que a partir de la 3ª semana de diferenciación (figura 12E y F), dicha morfología iba apareciendo, sobre todo en aquellos cultivos con medio de diferenciación con dexametasona. A la 6ª semana, todo el cultivo presentaba dicha morfología (figura 12H e I), tanto aquellos con dexametasona en el medio de diferenciación como los que no, mientras que aquellos cultivos con medio de mantenimiento no presentaban dicho aspecto (figura 12D y G).

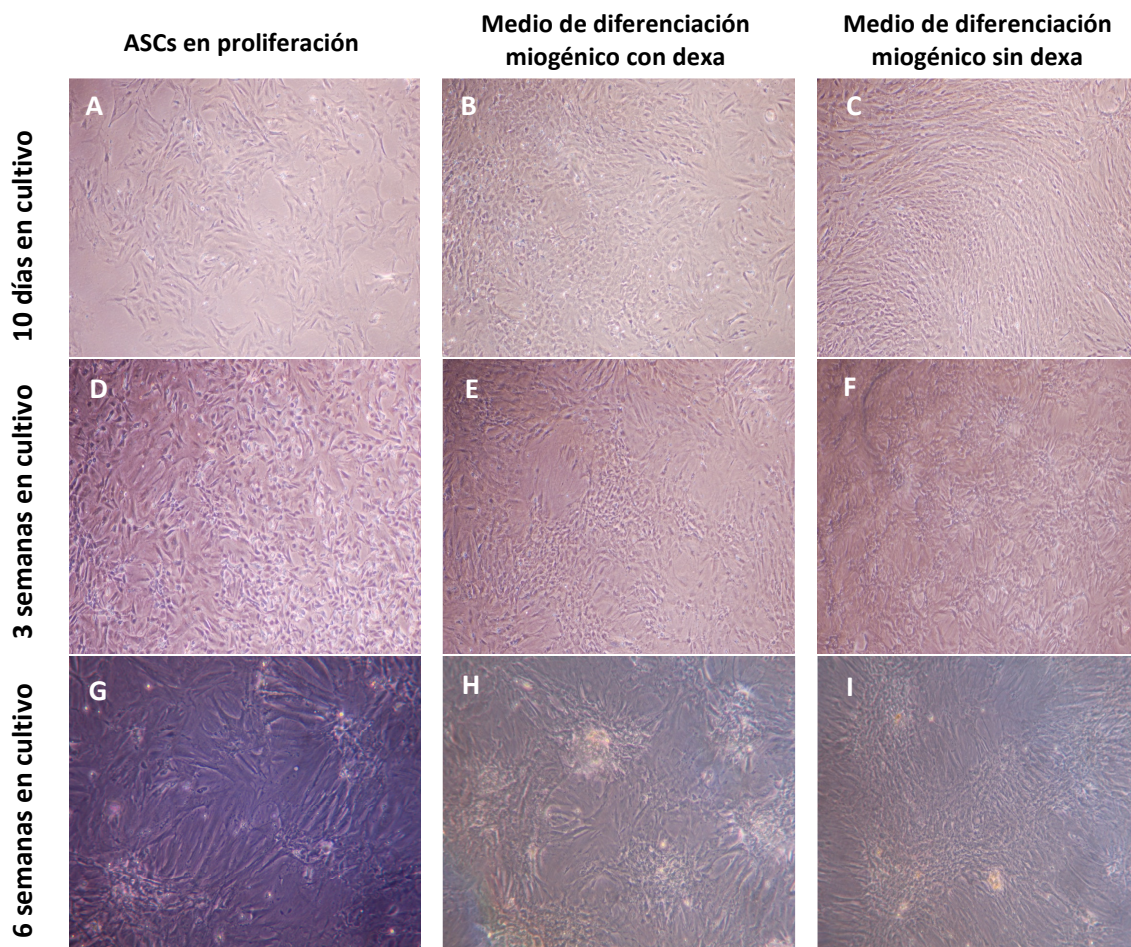


Figura 12: Evolución morfológica, a lo largo de 6 semanas, del cultivo de ASCs con medio de mantenimiento como con medio de diferenciación con y sin dexta. Imágenes A, B y C: Evolución del cultivo a los 10 días (40X); Imágenes D, E y F: Evolución del cultivo a los 21 días (aumento 40X); Imágenes G, H e I: Evolución del cultivo a las 6 semanas (100X). Imágenes A, D y G: ASCs con medio de mantenimiento (40X); Imágenes B, E y H: ASCs con medio de diferenciación miogénico con dexta; Imágenes C, F e I: ASCs con medio de diferenciación sin dexta. A las 6 semanas (imágenes H e I) con medio de diferenciación (con y sin dexta) se observó una morfología de “valles y montañas”, mientras que en las ASCs tras 6 semanas de cultivo con medio de mantenimiento no presentaba dicha morfología (imagen G).

4.2. Expresión de marcadores moleculares de músculo liso y estriado

4.2.1. RT-PCR

Se hizo RT-PCR para los 8 marcadores moleculares, tanto de músculo liso como estriado (figura 13). MyoD1, Myf6 y Myh2 se expresaron únicamente en el control positivo para músculo estriado, no observándose en el resto de las muestras.

Con respecto a cald1, se pudo comprobar que existía expresión tanto en los controles positivos, en las ASCs en proliferación así como en las tratadas a diferentes tiempos. La expresión de cald1 en las ASCs no tratadas es, aparentemente, menor respecto a la expresión en las muestras problema.

Smoothelin se expresó en ASCs no tratadas y en aquellas con medio de diferenciación a los 3 tiempos estudiados, con y sin dexametasona. La expresión de éste marcador en el músculo estriado de rata era muy baja ya que la banda obtenida es muy tenue, al igual que en los cultivos con medio de mantenimiento respecto a las obtenidas en las muestras sometidas a diferenciación.

Se observó expresión de Myh11 tanto en ASCs con medio de mantenimiento, así como en aquellas que habían sido sometidas al tratamiento, aunque las bandas van siendo cada vez más tenues a medida que aumenta el tiempo en cultivo con el medio de diferenciación.

La α -actina fue expresada tanto en las células no tratadas como en las tratadas a diferentes tiempos, sin apreciarse ninguna diferencia aparente entre las diferentes muestras.

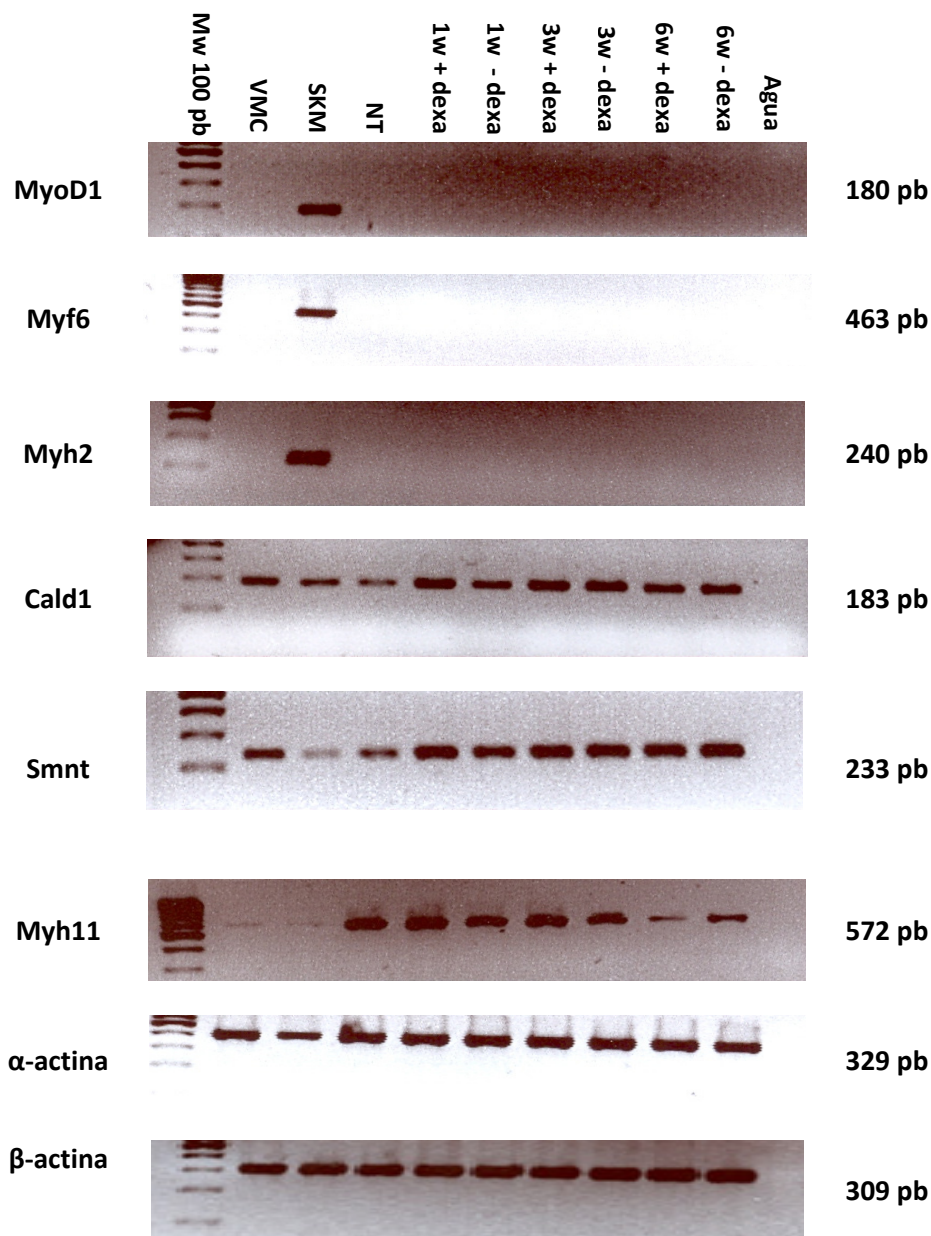


Figura 13: Gel de agarosa al 1,5 %, de ASCs en fase 3 con medio de mantenimiento así como con medio de diferenciación miogénico con y sin dextra tras 6 semanas de cultivo, para MyoD1, Myf6, MYH2, Cald1, Smnt, MYH11, α-actina y β-actina. Cada uno de los carriles son: carril 1: Mw 100 pb (marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases); carril 2: VMC: células de músculo vascular ratón (control positivo de la PCR para músculo liso); carril 3: SKM: Gastrocnemio de rata de 5 semanas (control positivo de la PCR para músculo esquelético); carril 4: No tratadas: ASCs con medio de mantenimiento en fase 3; carril 5: 1w + dextra: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 1 semana con medio de diferenciación con dextra 0,1 μM; carril 6: 1w - dextra: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 1 semana con medio de diferenciación miogénico sin dextra; carril 7: 3w + dextra: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 3 semanas con medio de diferenciación miogénico con dextra 0,1 μM; carril 8: 3w - dextra: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 3 semanas con medio de diferenciación sin dextra; carril 9: 6w + dextra: ASCs en fase 3 de rata cultivadas 6 semanas con medio de diferenciación sin dextra 0,1 μM; carril 10: 6w - dextra: ASCs en fase 3 de rata cultivadas 6 semanas con medio de diferenciación miogénico sin dextra; carril 11: Agua.

4.2.2. qPCR

Para comprobar si existían diferencias cuantitativas en la expresión de los marcadores de músculo liso, entre las ASCs tratadas y no tratadas, se realizó una qPCR con sondas de hidrólisis.

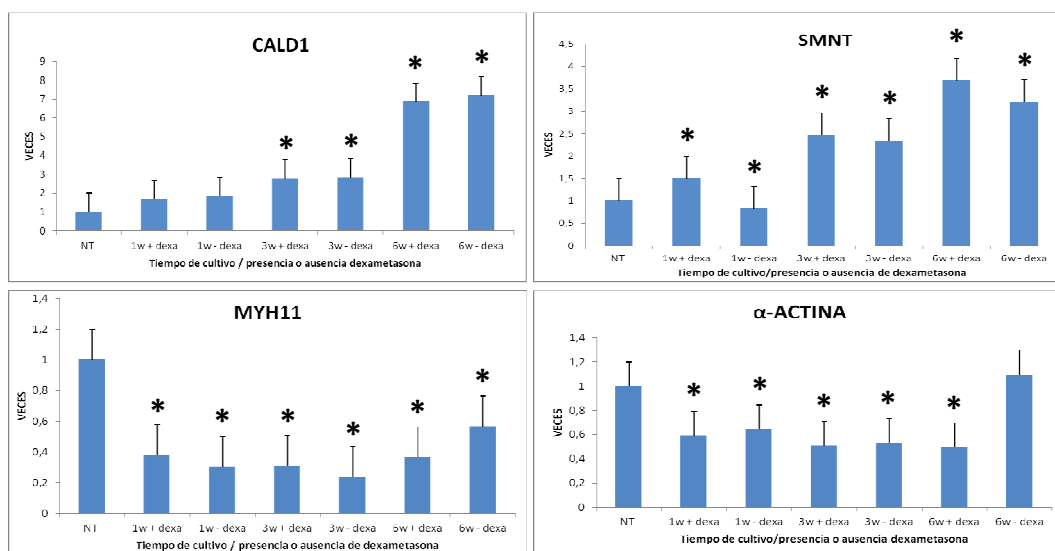
Se observó un incremento paulatino en la expresión de la **Cald1** a medida que aumentaba el tiempo de cultivo (gráfica 6), llegando a tener una expresión casi 7 veces mayor en las células tratadas con medio de diferenciación miogénico con dexametasona a las 6 semanas frente a las células no tratadas. Los valores de expresión, para un mismo tiempo de estudio, no difieren entre sí, por lo que la presencia de dexametasona no es relevante en el proceso de diferenciación de las ASCs hacia un fenotipo miogénico.

Al igual que ocurre con **cald1**, la expresión de **Smnt** se va incrementando a medida que aumentan las semanas en cultivo (gráfica 6), obteniéndose la máxima expresión a las 6 semanas de cultivo con dexametasona respecto de las células no tratadas. En este caso, para todos los tiempos analizados, la presencia de dexametasona incrementa ligeramente la expresión de smoothelin respecto de aquellas muestras que no la presentan, por lo que su presencia en el medio de cultivo ayuda a la hora de sobre-expresar este marcador.

Al contrario de lo que ocurre con la **cald1** y **smnt**, en los que el medio de diferenciación favorece su sobre-expresión respecto de las células no tratadas, la expresión de **Myh11** se ve inhibida por dicho medio de diferenciación (gráfica 6). Ésta va siendo menor a medida que aumenta el tiempo de cultivo hasta la 3ª semana de cultivo, a partir de la cual se ve aumentada pero sin llegar a ser mayor a la obtenida por las células no tratadas.

Si se analiza la expresión a 1 y 3 semanas de diferenciación, se pudo ver que ésta es ligeramente mayor en los casos en los que el medio contiene dexametasona, sin embargo transcurridas 6 semanas, la expresión de Myh11 en ausencia de dexametasona es mayor que en presencia de la misma.

La expresión de **α -actina** en ASCs sometidas al tratamiento de diferenciación respecto de las células sin tratar, se ve inhibida a medida que aumenta el tiempo de cultivo. A las 6 semanas de diferenciación y en ausencia de dexametasona, la expresión de α -actina se ve incrementada llegando al nivel de las células no tratadas con medio de diferenciación (gráfica 6). Los valores a 1 y 3 semanas, con y sin dexametasona, no difieren entre sí, de manera que la expresión de este marcador a estos dos tiempos no depende de la presencia de dexametasona, sin embargo a las 6 semanas de cultivo, la ausencia de dexametasona parece favorecer la expresión de α -actina, haciendo que incremente su expresión casi al mismo nivel que el de las células no tratadas.



Gráfica 6: Cuantificación relativa de la expresión de Cald1, Smnt, MYH11 y α -actina en ASCs con medio de diferenciación miogénico respecto de las no tratadas. NT: ASCs no tratadas (ASCs con medio de mantenimiento en fase 3); 1w + dexta: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 1 semana con medio de diferenciación con dexta 0,1 μ M; 1w - dexta: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 1 semana con medio de diferenciación miogénico sin dexta; 3w + dexta: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 3 semanas con medio de diferenciación miogénico con dexta 0,1 μ M; 3w - dexta: ASCs de rata en fase 3 cultivadas 3 semanas con medio de diferenciación sin dexta; 6w + dexta: ASCs en fase 3 de rata cultivadas 6 semanas con medio de diferenciación sin dexta 0,1 μ M; 6w - dexta: ASCs en fase 3 de rata cultivadas 6 semanas con medio de diferenciación miogénico sin dexta; Eje X: tiempo de cultivo en presencia o ausencia de dexta en el medio de diferenciación miogénico. Eje Y (VECES): Veces de más o menos que se expresa el gen de interés en las ASCs diferenciadas respecto de las no tratadas. Asterisco: Indica diferencias significativas entre las muestras tratadas respecto de las muestras no tratadas. Cada tiempo de estudio es expresado como la media de los duplicados + error estándar

4.2.3. Inmunocitoquímica

Se realizó inmunocitoquímica para 3 de los marcadores analizados mediante PCR, Cald1, Smnt y MYH2. Se confirmaron los resultados obtenidos previamente mediante PCR (gráfica 6 y figura 13) para cada uno de los 3 marcadores analizados. Se detectó cald1 y smnt en las muestras tratadas con medio de diferenciación, tanto con dexta como en ausencia de ella (figura 14B, C, E y F), frente a las muestras no tratadas (figura 14A y D), mientras que en el caso de la Myh2 se detectó únicamente en las ASCs sometidas al tratamiento de diferenciación (figura 14G), siendo negativa la inmunocitoquímica para las ASCs con medio de diferenciación miogénico con y sin dexta (figura 14H e I).

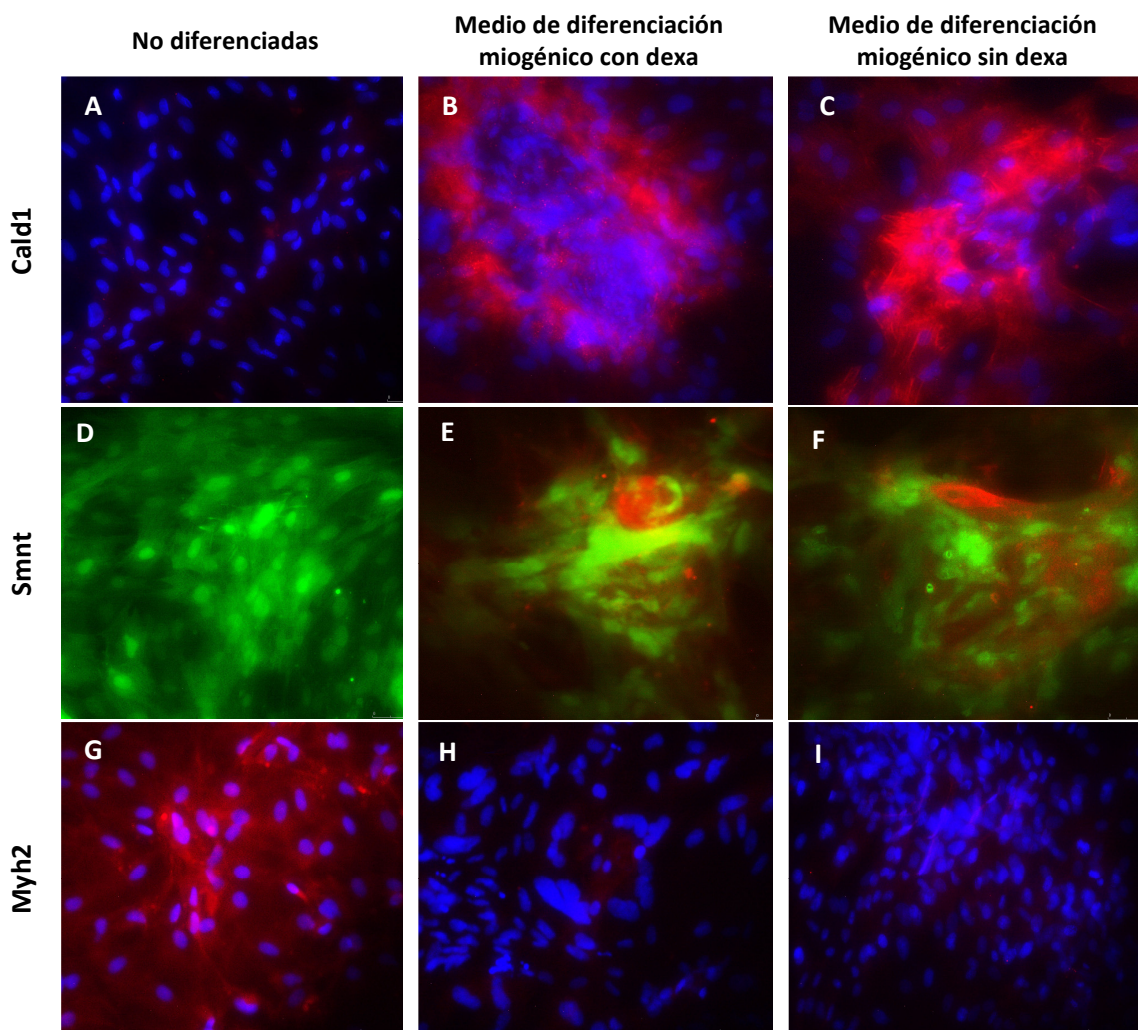


Figura 14: Inmunocitoquímica de ASCs tratadas y no tratadas con medio de diferenciación miogénico a las 6 semanas para Cald1, Smnt y Myh2. Imágenes A, B y C: Inmunocitoquímica para cald1 de ASCs en pase 3. Aumento 100X; Imágenes D, E y F: Inmunocitoquímica para Smnt de ASCs en pase 5. Aumento 100X; Imágenes G, H e I: Inmunocitoquímica para Myh2 de ASCs en pase 3. Aumento 100X; Imágenes A, D y G: ASCs con medio de mantenimiento durante 7 días; Imágenes B, E y H: ASCs con medio de diferenciación miogénico con dexta a las 6 semanas; Imágenes C, F e I: ASCs con medio de diferenciación miogénico sin dexta a las 6 semanas. Azul: Núcleos teñidos con DAPI; Rojo: anticuerpo correspondiente a estudiar en cada caso; Verde: ASCs positivas para GFP.

5. Transducción de ASCs con lentivirus para GFP

5.1. Imágenes al microscopio de fluorescencia

Transcurridas 24 horas tras la transducción, se observaron las ASCs al microscopio de fluorescencia. Se pudo comprobar que las ASCs, transducidas en pase 2 (figura 15A), habían integrado el plásmido vírico, siendo éstas positivas para GFP en los pases sucesivos (figuras 15B).

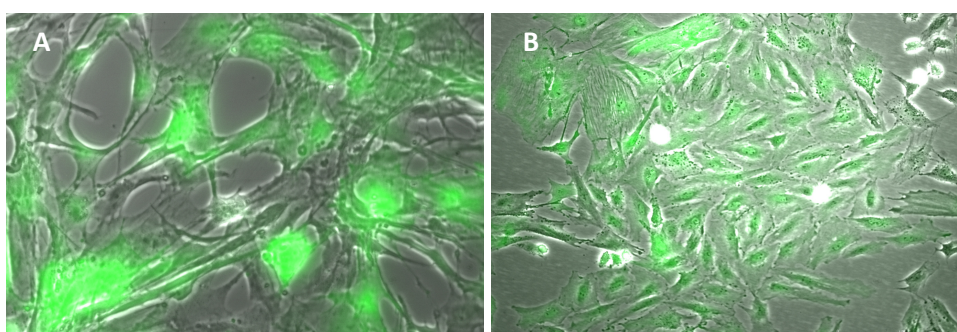


Figura 15: Imágenes de ASCs positivas para GFP. Imagen A: ASCs positivas para GFP en pase 2 (200X); Imagen B: ASCs positivas para GFP en pase 8 (100X); Verde: GFP.

5.2. Caracterización de las ASCs transducidas con lentivirus para GFP

5.2.1. Diferenciación adipogénica y osteogénica

Tras la transducción, se realizó la diferenciación a osteocitos y adipocitos, para comprobar que las características de diferenciación no se habían visto alteradas. Se observaron depósitos de calcio (figura 16B) en ASCs-GFP con medio de diferenciación osteogénico así como vesículas de grasa (figura 16D) en el citoplasma de las células con medio de diferenciación adipogénico, respecto de sus controles (figura 16A y C).

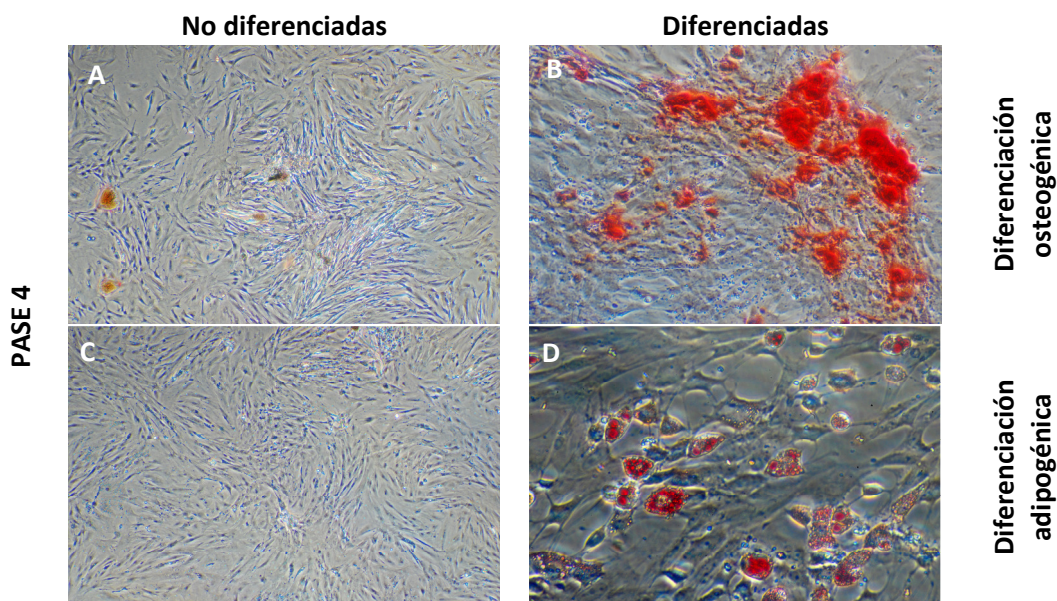
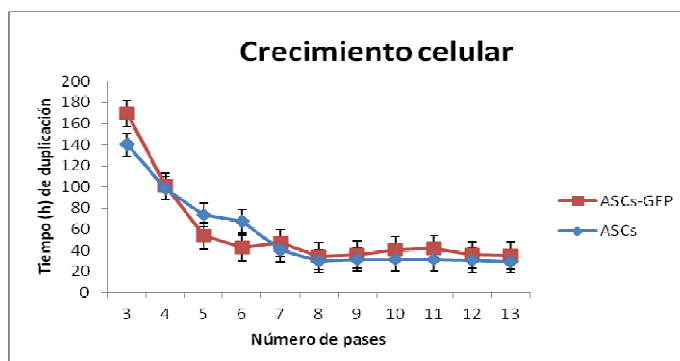


Figura 16: ASCs en pase 4, positivas para GFP, diferenciadas a osteocitos y adipocitos. Imágenes A y B: ASCs con medio de diferenciación osteogénico; Imágenes C y D: ASCs con medio de diferenciación adipogénico; Imágenes A y C: ASCs con medio de mantenimiento durante 7 días (aumento 40X). Imágenes B y D: ASCs diferenciadas (aumento 100X) a osteocitos y adipocitos, imagen B: ASCs con medio de diferenciación osteogénico durante 25 días teñidas con rojo alizarina Imagen D: ASCs con medio de diferenciación adipogénico durante 3 semanas teñidas con Oil Red O.

5.2.2. Crecimiento celular de ASCs-GFP

Se comparó el crecimiento de la población celular a lo largo de los diferentes pases realizados, calculando el tiempo de duplicación (epígrafe 4.4 de Material y Métodos), comparándolo con el de las ASCs no transducidas. Se observó que dicho crecimiento se estabilizaba a partir del pase 8, con una media de una duplicación cada 30-32 horas (gráfica 7).



Gráfica 7: Comparación del tiempo de duplicación (horas) de ASCs positivas para GFP respecto de las que no. Gráfica azul: ASCs no transducidas; Gráfica marrón: ASCs transducidas.; Eje X: número de pases estudiados; Eje Y: Tiempo de duplicación de la población celular medido en horas.

5.2.3. Unidades formadoras de colonias (CFU-Fs)

De igual manera que ocurrió con las ASCs no transducidas, las ASCs positivas para GFP mostraron capacidad de formar colonias con aspecto fibroblástico, tal y como se muestra en las imágenes a continuación (figura 17A y B).

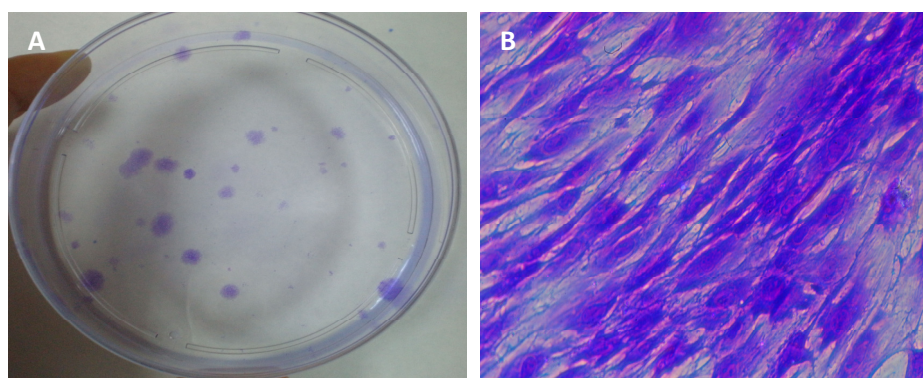
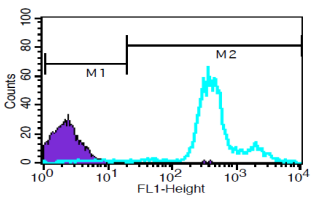
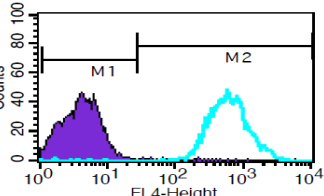
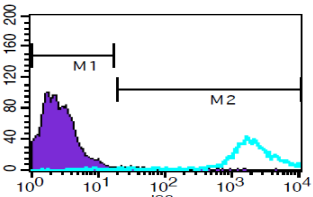
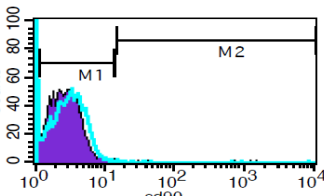


Figura 17: CFU-Fs para ASCs-GFP en pase 4. Imagen A: colonias de ASCs positivas para GFP en pase 4 teñidas con cristal violeta al 0,1%; Imagen B: Aumento 100X de una colonia teñida con cristal violeta.

5.2.4. Análisis de marcadores de superficie en ASC-GFP así como porcentaje de células positivas para GFP

Se contabilizó el porcentaje de ASCs positivas para GFP mediante citometría de flujo obteniéndose un 98,66%. Se observó un porcentaje muy parecido para cada marcador de superficie (tabla 6), siendo un 99,79% para CD29, 99,27% para CD90, mientras que para los marcadores CD11b y CD45 se obtuvieron un 94,37% y 95,98% de células negativas respectivamente.

Marcadores positivos	Histograma	% células positivas
Células positivas para GFP		98,66%
CD29-Alexa 647		99,79%
CD90-Alexa 647		99,27%
Marcadores negativos	Histograma	% células negativas
CD11b-Alexa 647		94,37%

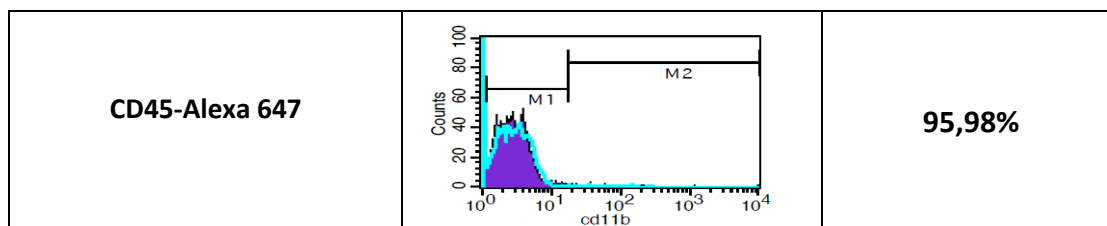


Tabla 6: Cuantificación de porcentaje de ASCs positivas para GFP así como estudio de marcadores de superficie para ASCs-GFP. Población con más de un 90% de ASCs positivas para CD29, y CD90 y más de un 90% de ASCs negativas para CD11b y CD45. Eje X del histograma: Intensidad de fluorescencia para el anticuerpo dado. Eje Y del histograma: Número de eventos analizados en cada muestra. M1: región del histograma negativa para un anticuerpo dado; M2: región del histograma positiva para un anticuerpo dado. Histograma morado: Células marcadas con el isotipo control. Histograma azul: células marcadas con el anticuerpo en concreto que se quiere estudiar.

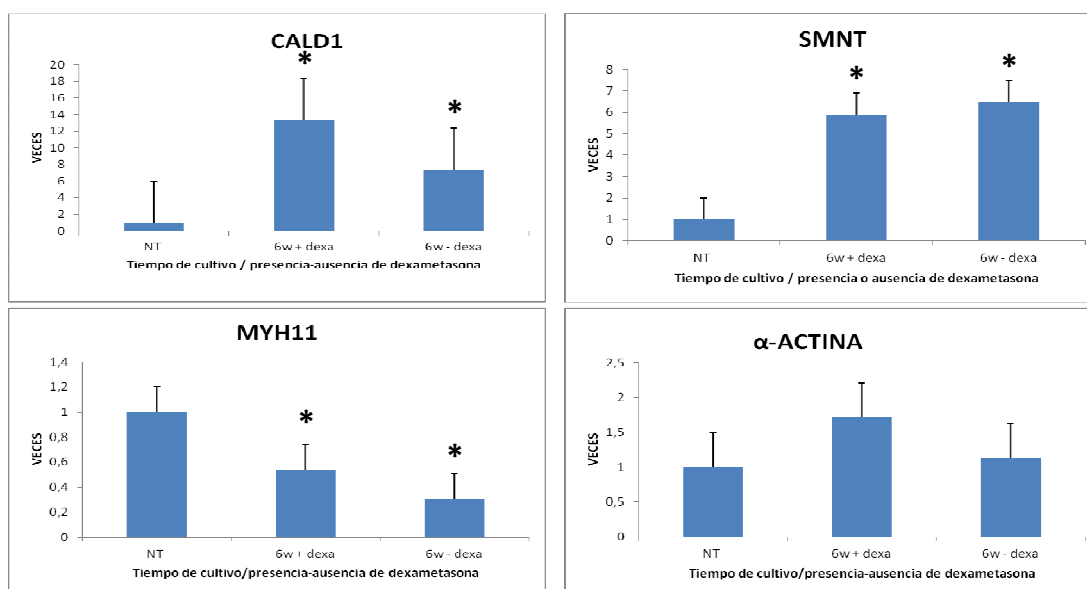
5.2.5. Análisis de expresión mediante PCR a tiempo real de *cald1*, *smnt*, *MYH11* y α -actina

Se quiso comprobar que los patrones de expresión de los marcadores de músculo liso, previamente estudiados mediante qPCR y PCR a tiempo final en ASCs sin transducir, (figura 13 y gráfica 6) se mantenían.

La expresión de *Smnt* así como de *Cald1* en ASCs-GFP con medio de diferenciación era superior a la encontrada en las ASCs no diferenciadas (gráfica 8). En el caso de *Cald1*, la expresión obtenida en los cultivos con medio miogénico con dexametasona era casi 14 veces superior a la encontrada en las ASCs en proliferación. De la misma forma, la expresión de *Smnt* obtenida en los cultivos tratados con medio de diferenciación con y sin dexametasona, era 6 veces superior a la obtenida en las ASCs en proliferación.

La expresión de *MYH11* tras 6 semanas en cultivo con medio de diferenciación se vio inhibida (gráfica 8).

Con respecto a la α -actina, la expresión en ASCs-GFP tratadas con medio miogénico con dexta, es ligeramente superior a las no tratadas, aunque dicho aumento no es estadísticamente significativo, mientras que las células tratadas con medio miogénico sin dexta era muy similar a las no tratadas.



Gráfica 8: Cuantificación relativa de la expresión de Cald1, Smnt, MYH11 y α -actina en ASCs-GFP cultivadas con medio de diferenciación miogénico en fase 5 respecto de las ASCs-GFP en proliferación. Eje X: Tiempo en cultivo y presencia o ausencia de dexta en el medio de cultivo de diferenciación miogénico. NT: ASCs no tratadas con el medio de diferenciación (cultivos con medio de mantenimiento); 6w + dexta: ASCs con medio de diferenciación con dexta 0,1 μ M durante 6 semanas; 6w - dexta: ASCs con medio de diferenciación sin dexta durante 6 semanas; Eje Y (VECES): Veces de más o menos que se expresa un gen respecto de las células NT. Asterisco: Indica la existencia de diferencias significativas entre las ASCs-GFP con medio de diferenciación miogénico respecto de las ASCs-GFP en proliferación. Cada tiempo de estudio es expresado como la media de los duplicados + error estándar

6. Terapia celular: efecto de las ASCs en tejidos dañados

6.1. Estudio histológico y detección de ASCs-GFP en los tejidos dañados

Se realizó un estudio histológico del tejido a los 4 días y a las 4 semanas del daño, para evaluar el efecto de las ASCs en los tejidos, durante el proceso de regeneración tisular, así como un estudio de microscopía de fluorescencia para localizar aquellas positivas para GFP.

6.1.1. Tejido con ASCs sin diferenciar

6.1.1.1. Estudio histológico a los 4 días tras el daño

6.1.1.1.1. Tinción Hematoxilina/eosina

Tal y como muestran las imágenes tomadas a los 4 días tras el daño, se observó un grupo de células situado entre la mucosa y el anillo de músculo liso (figura 18A y C), así como cierto infiltrado linfocitario alrededor de la herida. Además el tejido presentó una herniación de la mucosa debido a la ruptura de la capa muscular (figura 18A y B). También se pudieron observar pequeños grupos de núcleos encapsulados en la zona de la mucosa (figura 18D)

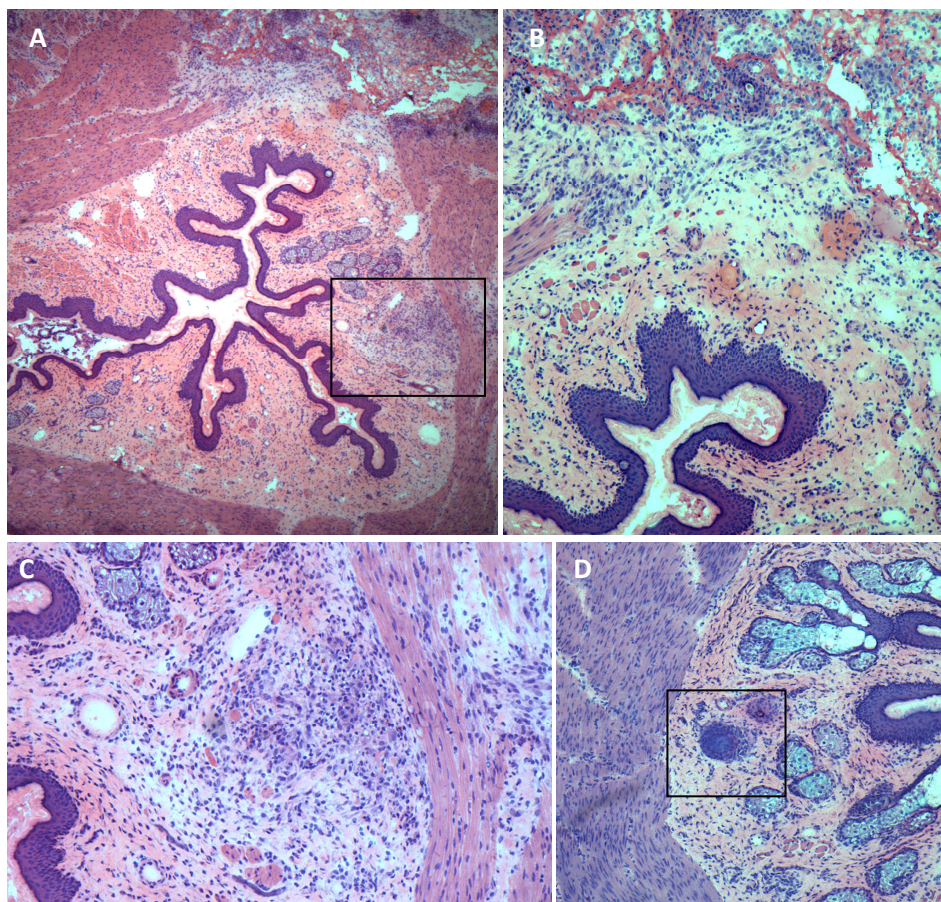


Figura 18: Hematoxilina/eosina a los 4 días de haber realizado el daño y de haber inyectado 10^6 ASCs en proliferación. Imagen A: Imagen general de la zona de daño a un aumento del 40X. Recuadrado en negro se resalta el grupo de células encontrado. Se observa la sección del músculo liso y estriado; Imagen B: Aumento 100X de la zona lesionada; Imagen C: Aumento 200X del grupo celular encontrado; Imagen D: Recuadrado en negro se muestra un grupo de núcleos celulares encapsulados en la mucosa. Aumento 40X

6.1.1.1.2. Imágenes al microscopio de fluorescencia

Las imágenes al microscopio de fluorescencia mostraron que dicho grupo de células observado en la tinción de hematoxilina (figura 18A y C) eran ASCs positivas para GFP (figura 19), las cuales se habían inyectado en el momento de realizar el daño.

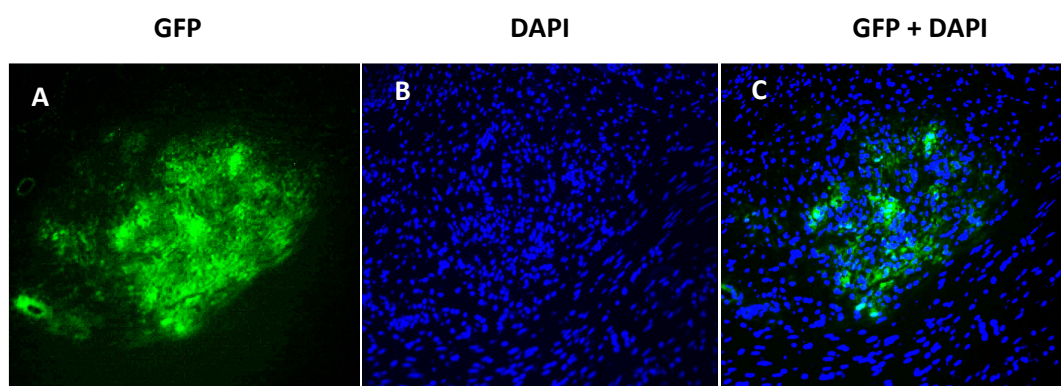


Figura 19: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASCs-GFP en proliferación. Imagen A: ASCs positivas para GFP (100X); Imagen B: núcleos teñidos con DAPI (azul) (100X); Imagen C: imágenes de DAPI y fluorescencia para GFP superpuestas (100X).

6.1.1.2. Estudio a las 4 semanas tras el daño

6.1.1.2.1. Tinción hematoxilina/eosina

Al cabo de 4 semanas, se comprobó que la capa muscular se había restaurado casi por completo, aunque se encontró una pequeña región en la que se apreciaba cierta interrupción del anillo de músculo liso, lo que podría indicar la zona donde se realizó la herida 4 semanas atrás (figura 20A y B).

También se observaron acúmulos de núcleos celulares incluidos en la mucosa (figura 20C). No se sabe con exactitud que pueden ser, aunque se piensa que podrían ser infiltrados linfocitarios crónicos encapsulados en la mucosa.

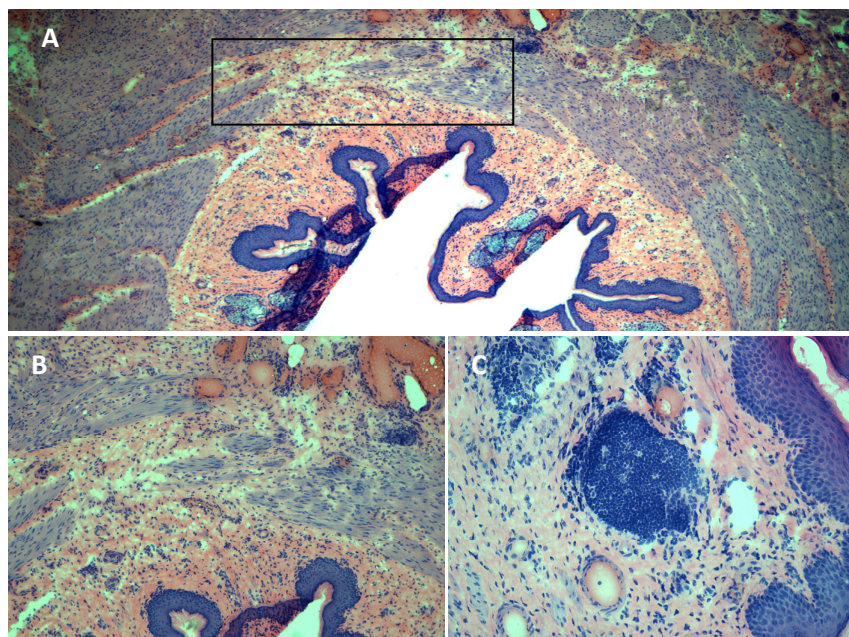


Figura 20: Hematoxilina/eosina de un tejido dañado con 10^6 ASCs en proliferación a las 4 semanas. Imagen A: Imagen general del tejido, a un aumento de 40X. Recuadrado en negro se muestra la zona donde se hizo el daño; imagen B: Aumento 100X de la zona de daño; Imagen C: aumento 200X de un grupo celular encontrado en la mucosa a las 4 semanas del daño.

6.1.1.2.2. Tinción de Masson

Se realizó una tinción de Masson observando que, en la zona donde se encontraba la cicatriz producida por la sección del esfínter, se había generado fibrosis (figura 21)

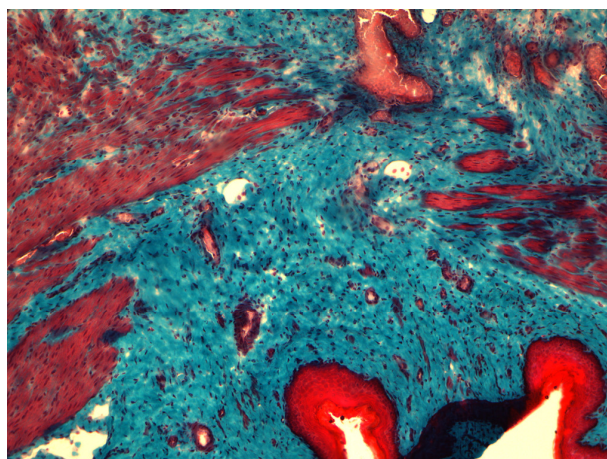


Figura 21: Tinción de Masson del tejido dañado con 10^6 ASCs en proliferación 4 semanas después de realizar el daño. Aumento 100X.

6.1.1.2.3. Imágenes de microscopía de fluorescencia

Al observar los cortes al microscopio de fluorescencia, se encontró un pequeño grupo celular en zonas internas de la mucosa, muy cercana de la luz del canal anal, el cual daba positivo para GFP (Figura 22). Los grupos de núcleos encontrados en la tinción de hematoxilina (figura 20C), no dieron positivo para GFP.

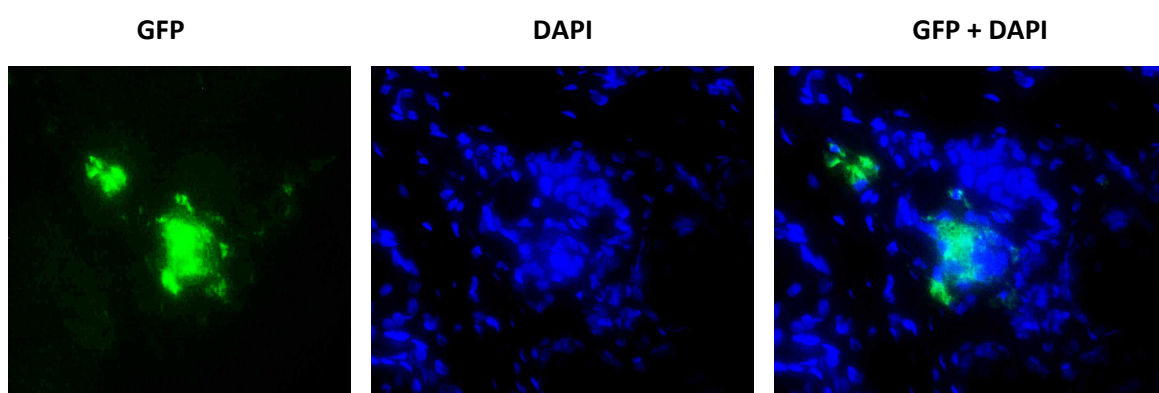


Figura 22: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a las 4 semanas a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASCs-GFP en proliferación. Imagen A: ASCs positivas para GFP (200X); Imagen B: núcleos teñidos con DAPI (200X)(azul); Imagen C: imágenes de DAPI y fluorescencia para GFP superpuestas (200X).

6.1.2. Tejido con ASCs con fenotipo miogénico

6.1.2.1. Estudio histológico a los 4 días tras el daño

6.1.2.1.1. Tinción hematoxilina/eosina

Al realizar la tinción de hematoxilina/eosina a los 4 días tras el daño, se pudo observar no sólo un grupo celular situado entre la mucosa y el músculo (23A y C), al igual que ocurría en el caso de tejidos con ASCs en proliferación a los 4 días (figura 18A y C), sino que además se encontraron células dispuestas alrededor de la herida realizada (figura 23B)

También se pudo ver un pequeño grupo de núcleos celulares encapsulado en la zona de la mucosa, al igual que ocurría en tejidos con ASCs en proliferación a los 4 días (figura 18D).

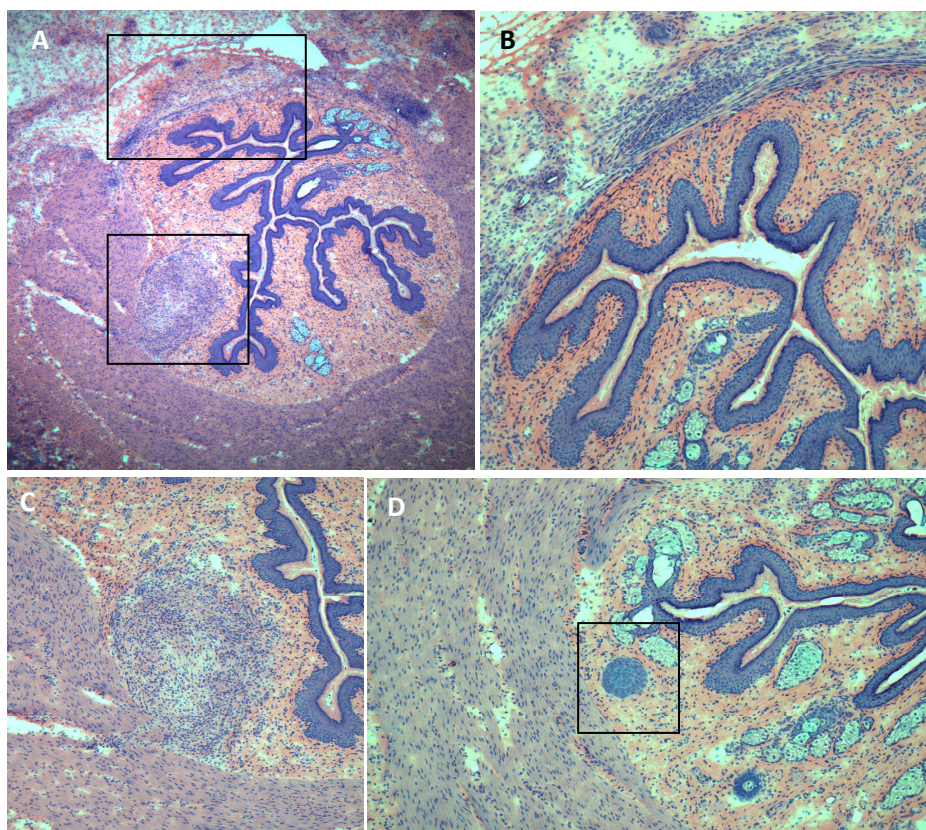


Figura 23: Hematoxilina/eosina a los 4 días de haber realizado el daño y de haber inyectado 10^6 ASCs con fenotipo miogénico. Imagen A: Imagen general de la zona a un aumento 40X. Se observa la sección del músculo liso y estriado. Recuadrado en negro se resaltan las ASCs positivas para GFP inyectadas y la sección realizada en ambos esfínteres; Imagen B: Aumento 100X de la zona lesionada, donde se observan células dispuestas a lo largo del daño; Imagen C: Imagen a mayor aumento (200X) del grupo de ASCs encontrado entre la mucosa y el tejido muscular liso recuadrado en la imagen A. Imagen D: Aumento 100X de una zona de la mucosa. Recuadrado en negro se muestra un pequeño grupo de células encapsulado.

6.1.2.1.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia

Las ASCs previamente inyectadas, positivas para GFP, se localizaron dispuestas alrededor de la herida (figura 24A-C), y entre la mucosa y el músculo liso (figura 24D-F), coincidiendo estos resultados con los observados en la hematoxilina (figura 23B y C)

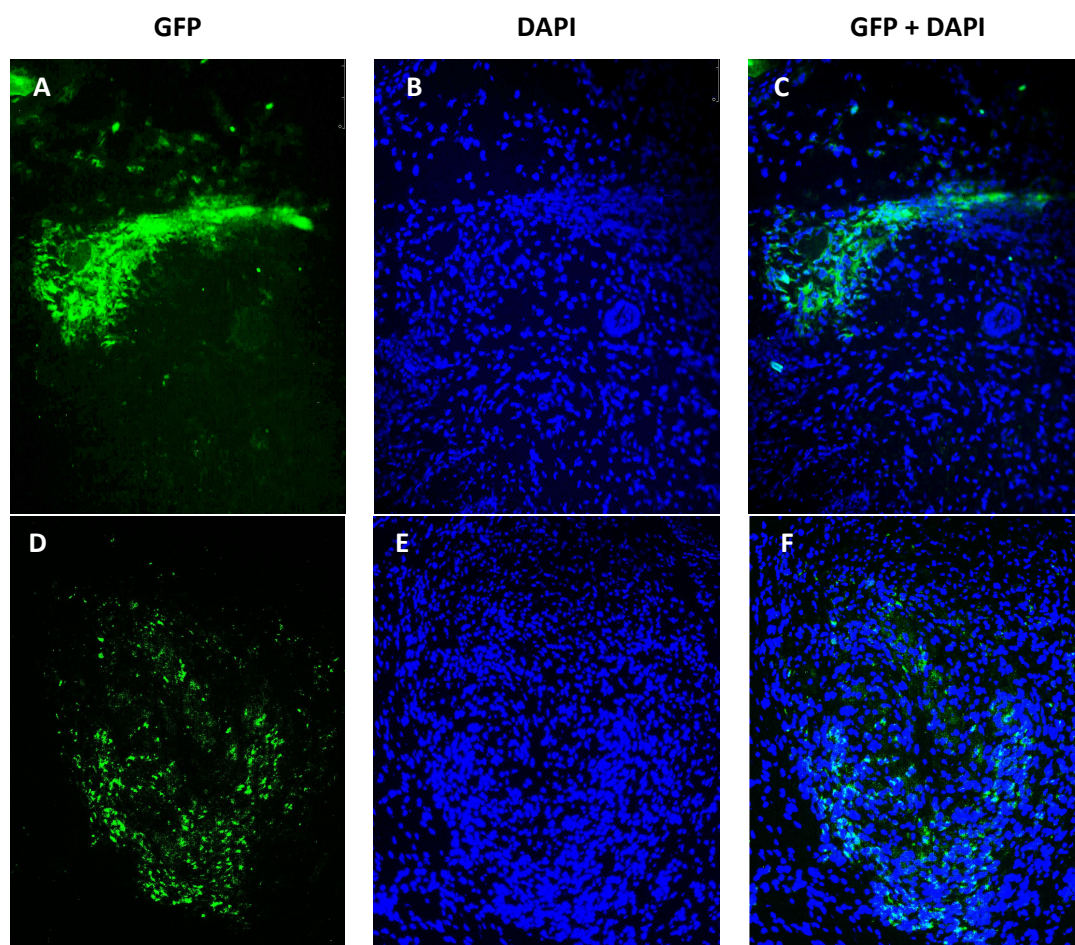


Figura 24: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les inyectó 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico. Imágenes A y D: ASCs positivas para GFP (100X). Imagen A: ASCs dispuestas en la zona de la herida (100X), imagen D: ASCs encontradas entre el músculo liso y la mucosa (100X); Imágenes B y E: núcleos teñidos con DAPI (azul) (100X); Imágenes C y F: imágenes de DAPI y fluorescencia para GFP superpuestas (100X).

6.1.2.2. Estudio histológico a las 4 semanas tras el daño

6.1.2.2.1. Tinción hematoxilina/eosina

A las 4 semanas de haber hecho el daño, se encontró una zona donde los anillos musculares estaban completamente interrumpidos e inclusive existía herniación de la mucosa (figura 25A y B), situación encontrada a los 4 días de realizar la herida en aquellos tejidos con ASCs con fenotipo miogénico como con ASCs en proliferación (figuras 18 y 23).

También se pudieron observar, al igual que ocurría en tejidos con ASCs en proliferación las 4 semanas del daño (figura 20C), grupos grandes de núcleos situados en la mucosa (figura 25D) así como pequeños grupos de núcleos encapsulados en la mucosa (figura 25C).

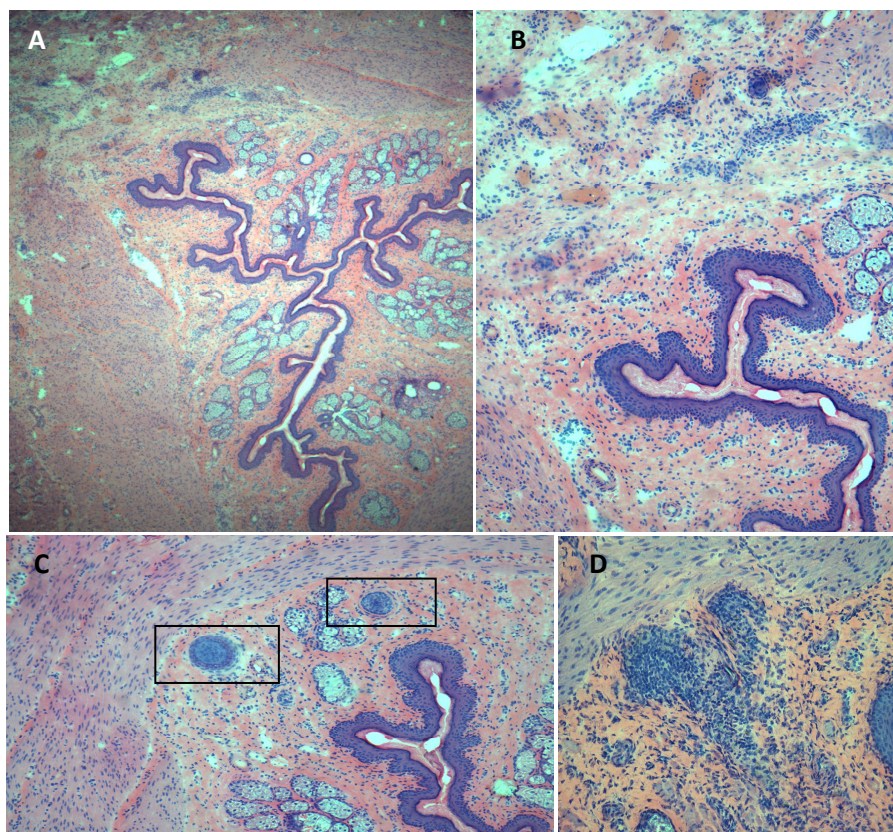


Figura 25: Tinción hematoxilina/eosina de una sección a las 4 semanas con 10^6 ASCs con fenotipo miogénico. Imagen A: Imagen general del corte, a un aumento 40X, donde se puede observar la sección de los dos anillos musculares. Imagen B: Aumento 100X de la zona lesionada; Imagen C: Recuadrados en negro se muestran pequeños grupos celulares encapsulados en la zona de la mucosa. Imagen D: Aumento 200X de núcleos celulares localizados en la mucosa, entre los que se encuentran las ASCs positivas para GFP.

6.1.2.2.2. Tinción de Masson

Transcurridas 4 semanas después del daño, al realizar la tinción de Masson, se observó que la zona donde se había realizado la herida había fibrotizado (figura 26A y B), al igual que ocurría en aquellos tejidos dañados a los cuales no se les había inyectado ASCs (figura 8K y L).

No se había reparado la sección realizada en la capa muscular, por lo que se produjo herniación de la mucosa. Además se pudo observar una zona donde había un pequeño grupo de células (figura 26C) en la zona de la mucosa.

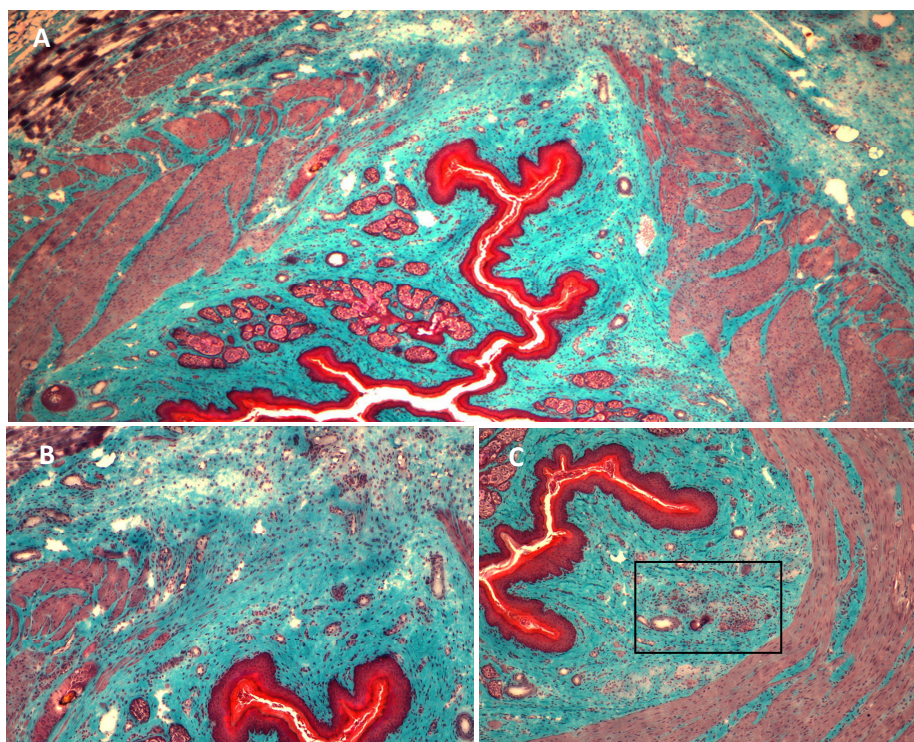


Figura 26: Tinción de Masson de tejidos dañados tras 4 semanas a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASC con fenotipo miogénico. Imagen A: imagen general de la zona de corte. Aumento 40X; Imagen B: aumento 100X de la zona de daño. Imagen C: En la zona recuadrada se muestra un detalle de la mucosa a un aumento de 100X, donde se observó una mayor concentración de núcleos.

6.1.2.2.3. Imágenes de microscopía de fluorescencia

En este caso, al observar las muestras en el microscopio de fluorescencia, los grupos de núcleos observados en la tinción de hematoxilina (figura 25D) daban positivo para GFP (figura 27A y C). Se localizaron ASCs dispuestas en zonas más internas de la mucosa (figura 27D y F), así como dispuestas entre el músculo liso en la mucosa (figura 27G e I).

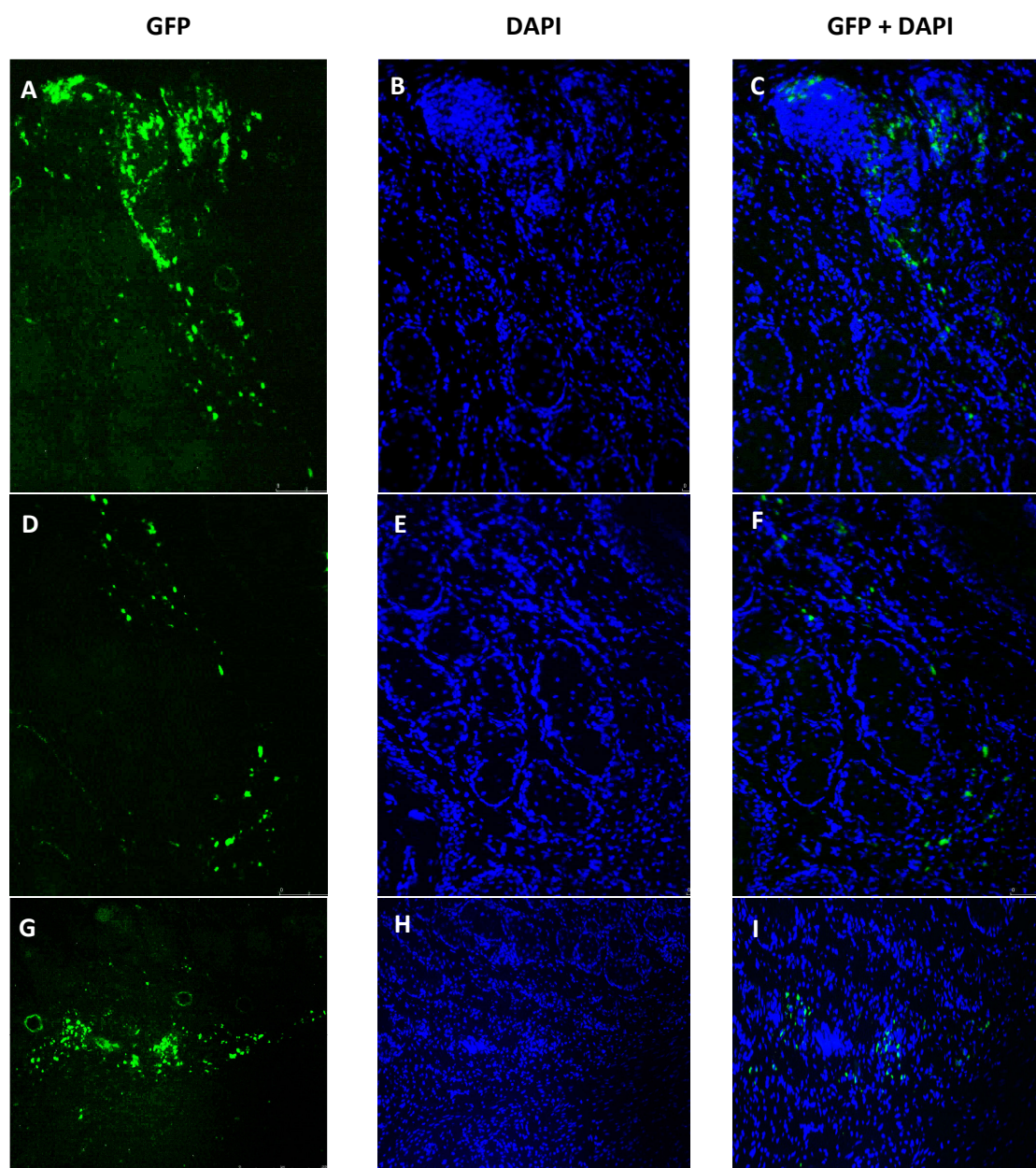


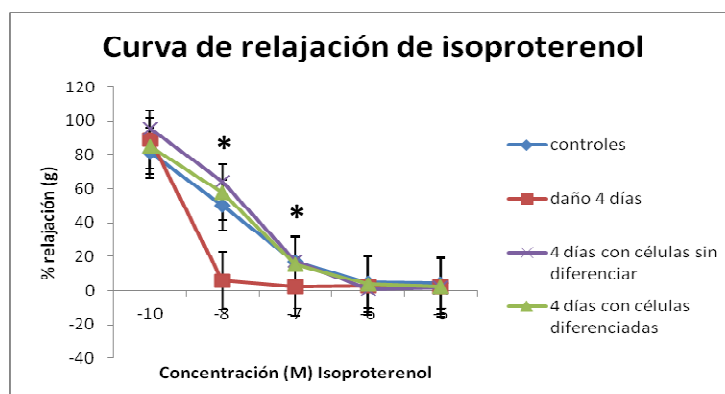
Figura 27: Imágenes al microscopio de fluorescencia de tejidos dañados a las 4 semanas a los cuales se les ha inyectado 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico. Imágenes A, D y G: ASCs positivas para GFP. Las imágenes A y D corresponden a un grupo celular encontrado en la mucosa; Imagen G: grupo de ASCs-GFP dispuesto entre la mucosa y el músculo liso; Imágenes B, E y H: núcleos de las células teñidos con DAPI (azul)(100X); Imágenes C, F e I: imágenes de DAPI y fluorescencia para GFP superpuestas (100X).

6.2. Baño de órganos

Se realizó de nuevo un estudio en baño de órganos con el fin de poder valorar el efecto de las ASCs, con fenotipo miogénico y en proliferación, en el tejido dañado. Analizados los resultados obtenidos en los tejidos dañados, y ver que las curvas dosis-dependientes tras 1 y 4 semanas después del daño (gráficas 1, 2 y 3), para los 3 fármacos estudiados, eran muy parecidas a las obtenidas en los controles, se estudió únicamente el posible efecto de las ASCs a los 4 días tras haberlas inyectado en el tejido dañado, ya que era el tiempo en el cual se apreciaban las mayores diferenciadas. Cabe señalar que en el caso de tejidos dañados a una y 4 semanas a los que se les añadió salbutamol y carbacol (gráficas 2 y 3), sí que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a diferentes concentraciones. El *p-valor* obtenido en estos casos era muy cercano a 0,05, por lo que se consideró únicamente hacer el estudio a 4 días.

6.2.1. *Isoproterenol*

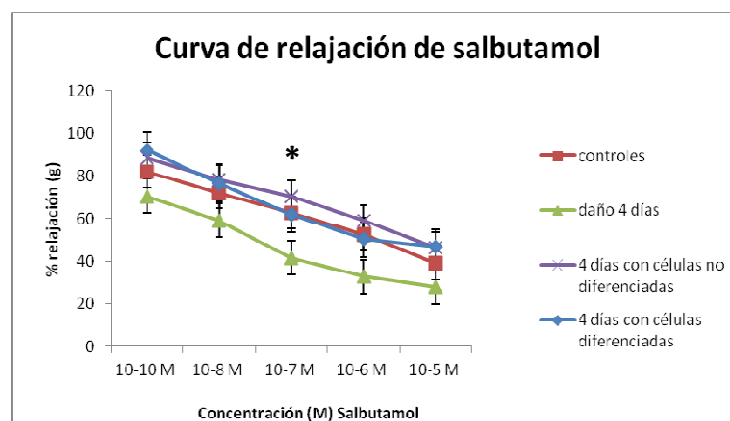
Se compararon las curvas de relajación de los tejidos dañados a los cuales se les había inyectado ASCs, con fenotipo miogénico como en proliferación, respecto de los controles y de los tejidos dañados (gráfica 9). Se obtuvieron curvas de relajación muy similares a las de los controles sin dañar en ambos casos.



Gráfica 9: Comparación de las curvas de relajación por isoproterenol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en marrón), tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les inyectó ASCs en proliferación (gráfica morada), tejidos dañados a los 4 días con ASCs con fenotipo miogénico (gráfica verde), respecto de las muestras control (gráfica en azul). Eje X: concentración (M) de isoproterenol; Eje Y: % relajación del tejido (en gramos) para una concentración dada de isoproterenol. Asterisco: Indica la existencia de diferencias significativas a una concentración de isoproterenol de 10^{-8} y 10^{-7} M entre la muestra control y la dañada a los 4 días. El % de relajación, para cada tiempo de estudio, es expresado como la media de 3 individuos \pm error estándar

6.2.2. Salbutamol

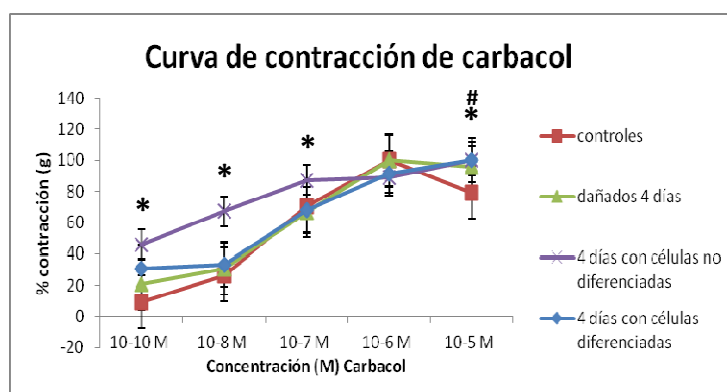
Al comparar las curvas obtenidas para salbutamol de tejidos dañados a los 4 días con ASCs, se observó un incremento en todos los valores de relajación, siendo éstos casi idénticos a los observados en los tejidos sanos (gráfica 10).



Gráfica 10: Comparación de las curvas de relajación por salbutamol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en verde), tejidos dañados a los 4 días con ASCs en proliferación (gráfica morada), tejidos dañados a los 4 días con ASCs con fenotipo miogénico (gráfica azul), respecto de las muestras control (gráfica en marrón). Eje X: concentración (M) de salbutamol; Eje Y: % relajación del tejido (en gramos) para una concentración dada de salbutamol. Asterisco: Indica la existencia de diferencias significativas a una concentración de salbutamol de 10^{-7} M entre la muestra control y la dañada a los 4 días. El % de relajación, para cada tiempo de estudio, es expresado como la media de 3 individuos \pm error estándar.

6.2.3. Carbacol

Al igual que ocurre en los casos anteriores, se observó que la capacidad de contracción del tejido con ASCs con fenotipo miogénico era idéntica a la de las muestras control, siendo dicha capacidad contráctil superior en el caso de los tejidos con ASCs en proliferación respecto de las muestras control (gráfica 11).



Gráfica 11: Comparación de las curvas de contracción por carbacol de tejidos dañados a los 4 días (gráfica en verde), tejidos dañados a los 4 días con ASCs en proliferación (gráfica morada), tejidos dañados a los 4 días con ASCs con fenotipo miogénico (gráfica azul), respecto de las muestras control (gráfica en marrón). Eje X: concentración (M) de carbacol; Eje Y: % de contracción del tejido (en gramos) para una concentración dada de carbacol. Asterisco: Indica la existencia de diferencias significativas a una concentración de carbacol de 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-5} M entre las muestras control y las muestras dañadas a los 4 días a los cuales se les inyectó ASCs en proliferación; #: indica diferencia significativa entre la muestra control y la dañada a los 4 días. El % de contracción, para cada tiempo de estudio, es expresado como la media de 3 individuos \pm error estándar.

6.3. Inmunohistoquímica para Ki-67

Se hizo una valoración de la capacidad proliferativa de las ASCs inyectadas *in vivo*, mediante una inmunohistoquímica para Ki-67.

6.3.1. *Tejidos sanos con ASCs no diferenciadas*

Se quiso, lo primero de todo, analizar si las ASCs eran capaces de dividirse en tejidos sanos. Mediante microscopía de fluorescencia, las ASCs-GFP se localizaron entre la mucosa y el anillo de músculo liso (figura 28A y B).

En ninguno de los dos tiempos estudiados se obtuvieron resultados positivos para Ki-67 (figura 28C y D), por lo que las ASCs en tejidos sanos no se dividen. Se observaron células positivas para Ki-67 en la base del epitelio anal.

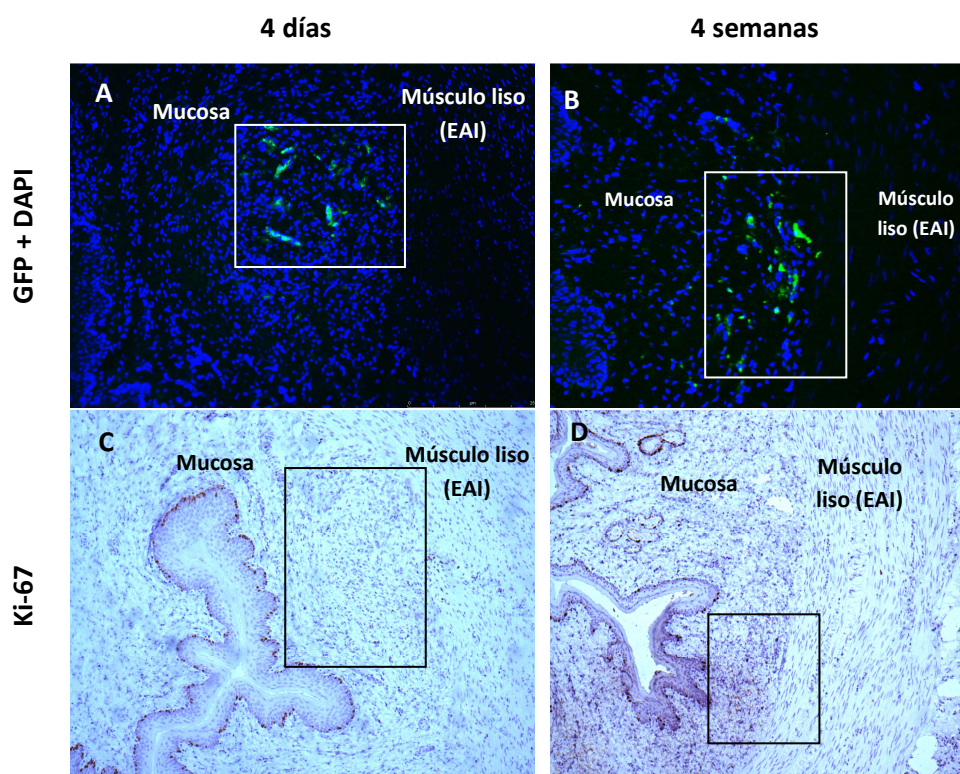


Figura 28: Localización por microscopía de fluorescencia e inmunohistoquímica para Ki-67 de ASCs-GFP en proliferación a los 4 días y 4 semanas en tejidos sanos. Imágenes A y B: Imágenes de microscopía de fluorescencia a los 4 días (imagen A) y 4 semanas (imagen B) (40X); Azul: núcleos teñidos con DAPI (40X); Verde: ASCs-GFP (40X); Imágenes C y D: Inmunohistoquímica para Ki-67 para ASCs-GFP a los 4 días (imagen C) y a las 4 semanas (imagen D). Aumento 40X; Recuadrado en todas las imágenes se muestra la localización de las ASCs-GFP.

6.3.2. Tejidos dañados con ASCs-GFP en proliferación tras 4 días y 4 semanas del daño

Si se analizan los resultados obtenidos de tejidos a los cuales se les realizó el daño y a los que se les había inyectado ASCs en proliferación tras **4 días**, se ve como (figura 29A y B), aunque pocas, hay células que dan positivo para Ki-67. También se observaron células positivas en la zona basal del epitelio, al igual que en los tejidos sanos.

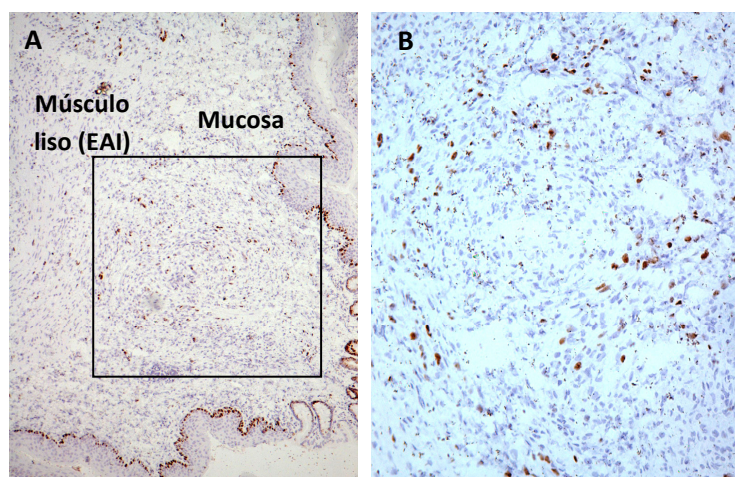


Figura 29: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejidos dañados con 10^6 ASCs-GFP en proliferación a los 4 días de realizar el daño. Recuadrado en negro (imagen A) se resaltan las ASCs inyectadas tras el daño. En marrón se observan las células positivas para Ki-67 (aumento 40X); Imagen B: Aumento 100 X del grupo de ASCs positivas para GFP inyectadas.

Transcurridas 4 semanas del daño, se analizó si las ASCs, que se habían localizado mediante microscopia de fluorescencia (figura 22A-C) en zonas internas de la mucosa, mantenían dicha capacidad de división *in vivo*. Tal y como se observa en la figura 30, no se encontraron células positivas para Ki-67.

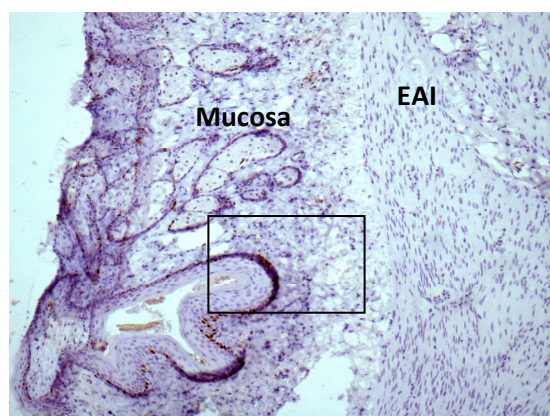


Figura 30: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejidos dañados con 10^6 ASCs-GFP en proliferación a las 4 semanas de realizar el daño. Recuadrado en negro se resalta la zona donde se localizaron mediante microscopía de fluorescencia las ASCs. Aumento de 40X.

6.3.3. Tejidos dañados con ASCs-GFP diferenciadas a fenotipo miogénico tras 4 días y 4 semanas del daño

Los resultados obtenidos mostraron que las ASCs con fenotipo miogénico a los **4 días** (figura 31A y B) tras su inyección, daban positivo para Ki-67, principalmente en la zona de la herida. Sin embargo, al contrario de lo que ocurría con las ASCs en proliferación, a las **4 semanas** (figura 32), aquellas tratadas con medio de diferenciación miogénico se siguen dividiendo.

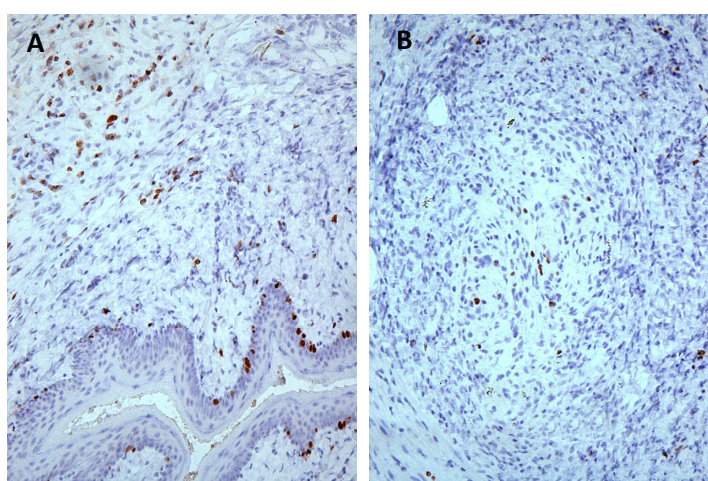


Figura 31: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejidos dañados a los 4 días a los cuales se les inyectó 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico. La imagen A (100X) corresponde a la zona de la herida y la imagen B (100X) del grupo de células encontrado entre la mucosa y el músculo liso. Los puntos marrones corresponden a ASCs positivas para Ki-67.

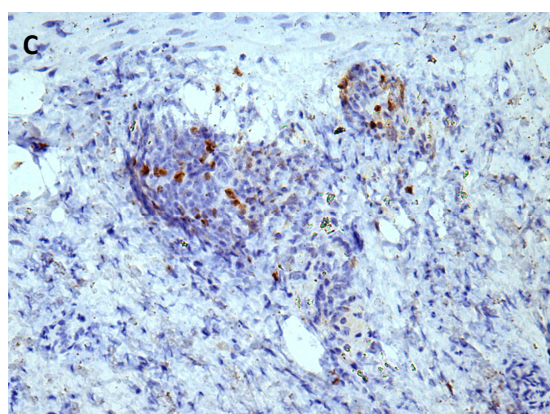


Figura 32: Inmunohistoquímica para Ki-67 de tejido dañado con 10^6 ASCs-GFP con fenotipo miogénico a las 4 semanas del daño. Los puntos marrones son células positivas para Ki-67. Aumento 200X.

6.4. Estudio de expresión de quimioquinas (SDF-1 y MCP-3) en tejidos dañados y sus receptores en ASCs durante la diferenciación miogénica

6.4.1. Expresión de receptores para SDF-1 y MCP-3 a lo largo de la diferenciación miogénica

Como ejemplo de expresión de receptor de quimioquinas en células diferenciadas se estudió CXCR4, mediante PCR a tiempo final, en ASCs diferenciadas a adipocitos durante 1, 2 y 3 semanas. Se observó (figura 33) como a medida que aumentaba el tiempo de cultivo con el medio de diferenciación, la expresión de CXCR4 iba disminuyendo. Tomando este patrón de expresión como ejemplo, se estudió la expresión de receptores específicos de las quimioquinas **SDF-1 y MCP-3** a lo largo de la diferenciación miogénica.

Según artículos publicados previamente³⁸, los 3 receptores estudiados se expresan en las MSCs en proliferación. Se observó dicho patrón de expresión en los receptores CCR1 y CXCR4, pero no con el CCR2 (figura 34).

A lo largo de las semanas de diferenciación, se observó a 1 semana con dexametasona que para los receptores **CCR1 y CXCR4** (figura 34) la expresión disminuía respecto de las ASCs en proliferación, siendo esta disminución más acusada en el caso del CXCR4. Para el resto de los tiempos estudiados, no se apreciaron diferencias al comparar dicha expresión con la obtenida en las ASCs en proliferación. Sin embargo la expresión de **CCR2** (figura 34) a lo largo de las 6 semanas de diferenciación fue distinta, ya que a 1 semana sin dexametasona y 6 semanas con dexametasona no se obtuvo expresión al igual que para las ASCs en proliferación, mientras que para el resto de tiempos estudiados sí que se obtuvo, aunque parecía que la expresión disminuía a medida que aumentaba el tiempo en cultivo.

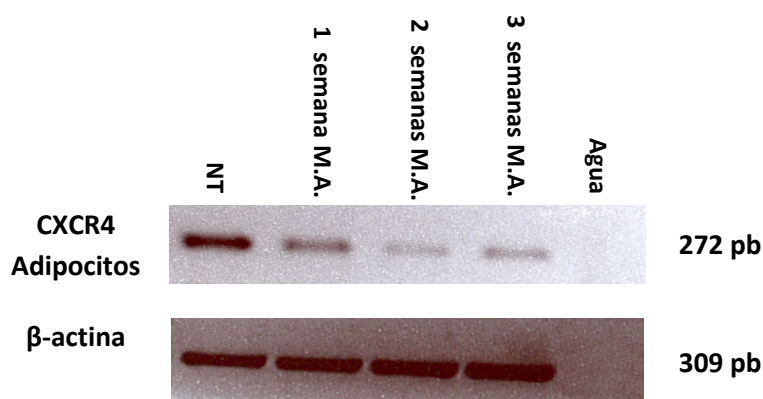


Figura 33: Gel de agarosa al 1,5 % para CXCR4 y β-actina en ASCs diferenciadas a adipocitos. Cada uno de los carriles son: carril 1: ASCs con medio de mantenimiento; carril 2: ASCs con medio de diferenciación adipogénico durante 1 semana; carril 3: ASCs con medio de diferenciación adipogénico durante 2 semanas; carril 4: ASCs con medio de diferenciación adipogénico durante 3 semanas; carril 5: Agua

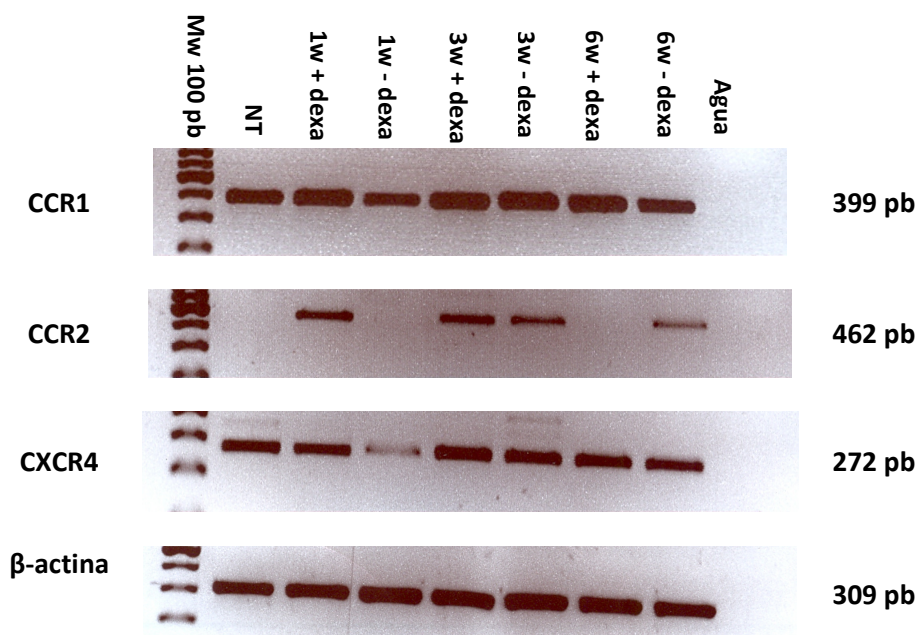


Figura 34: Gel de agarosa al 1,5 % para CCR1, CCR2, CXCR4 y β-actina en ASCs con medio miogénico y en proliferación. Cada uno de los carriles son: carril 1: Mw 100 bp (marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases); carril 2: No tratadas: ASCs con medio de mantenimiento en pase 5; carril 3: 1w + dexta: ASCs de rata en pase 3 cultivadas 1 semana con medio de diferenciación con dexta 0,1 μM; carril 4: 1w - dexta: ASCs de rata en pase 3 cultivadas 1 semana con medio de diferenciación miogénico sin dexta; carril 5: 3w + dexta: ASCs de rata en pase 3 cultivadas 3 semanas con medio de diferenciación miogénico con dexta 0,1 μM; carril 6: 3w - dexta: ASCs de rata en pase 3 cultivadas 3 semanas con medio de diferenciación sin dexta; carril 7: 6w + dexta: ASCs en pase 3 de rata cultivadas 6 semanas con medio de diferenciación con dexta 0,1 μM; carril 8: 6w - dexta: ASCs en pase 3 de rata cultivadas 6 semanas con medio de diferenciación miogénico sin dexta; carril 9: Agua.

6.4.2. Expresión de SDF-1 y MCP-3 en tejidos dañados así como en tejidos con células en proliferación y cultivadas en medio de diferenciación miogénico

Se comprobó la expresión de ambas quimioquinas en tejidos dañados a diferentes tiempos. Se observó existencia de expresión basal, tanto de SDF-1 y MCP-3 en tejidos sanos. La expresión a 4 días y 1 semana tras el daño, de ambas quimioquinas, era superior a la observada para los controles sanos, siendo ésta nula al 1 mes de realizar el daño (figura 35).

En aquellos tejidos con ASCs, se observó una disminución paulatina en la expresión de SDF-1 con respecto a la obtenida en los tejidos dañados (figura 36). Cabe señalar que la disminución en la expresión de SDF-1 parece ser ligeramente mayor en los tejidos con ASCs con medio de diferenciación que con ASCs en proliferación.

No se observó cambio alguno en la expresión de MCP-3 entre los tejidos con ASCs (figura 36) respecto de los dañados.

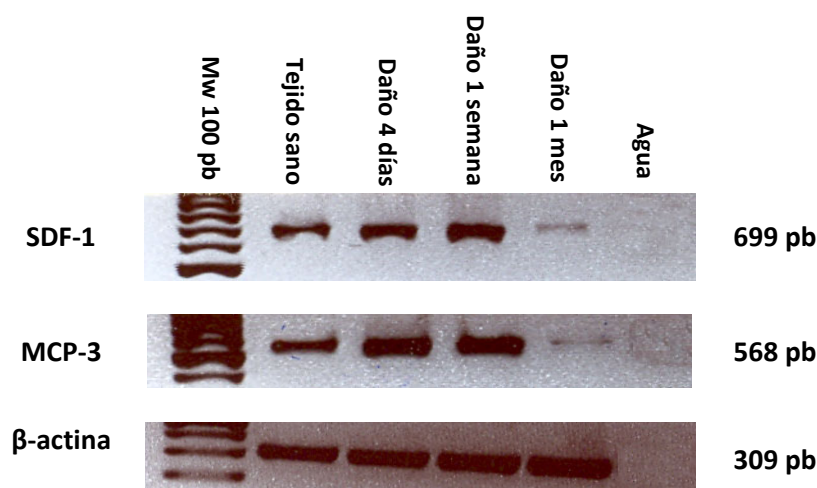


Figura 35: Gel de agarosa al 1,5 % para SDF-1, MCP-3 y β-actina en tejidos sanos así como dañados a diferentes tiempos de estudio. Cada uno de los carriles son: carril 1: Mw 100 bp (marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases); carril 2: tejido sano; carril 3: tejido a los 4 días de realizar el daño; carril 4: tejido una semana después de realizar el daño; carril 5: tejido 1 mes después de realizar el daño; carril 6: agua

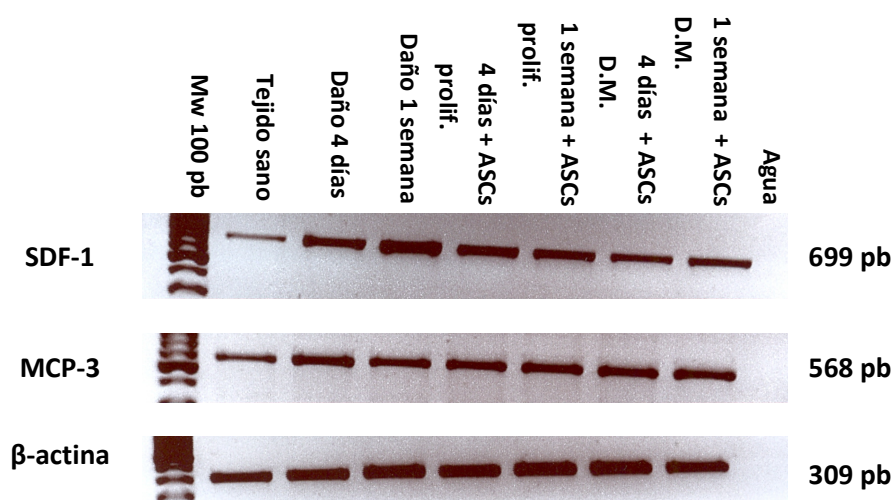


Figura 36: Gel de agarosa al 1,5 % para SDF-1, MCP-3 y β-actina en tejidos sanos y dañados a diferentes tiempos de estudio a los cuales se les inyectó ASCs con fenotipo miogénico como en proliferación. Cada uno de los carriles son: carril 1: Mw 100 bp (marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases); carril 2: tejido sano; carril 3: tejido a los 4 días de realizar el daño; carril 4: tejido una semana después de realizar el daño; carril 5: tejido dañado 4 días después de inyectar ASCs en proliferación; carril 6: tejido dañado 1 semana después de inyectar ASCs en proliferación; carril 7: tejido dañado 4 días después de inyectar ASCs cultivadas con medio de diferenciación miogénico; carril 8: tejido dañado 1 semana después de inyectar ASCs cultivadas con medio de diferenciación miogénico; carril 9: agua

Discusión

“En toda discusión, no es una tesis lo que se defiende, sino a uno mismo”

En los últimos años, los estudios sobre incontinencia anal han ido en aumento intentando buscar una nueva terapia debido a que las técnicas actuales sólo palian de forma temporal el problema. Las MSCs, ya sean de médula ósea, de tejido adiposo o derivadas del músculo han sido una alternativa estudiada en los últimos años, debido tanto a su capacidad proliferativa como de diferenciación a diferentes estirpes celulares. Además su papel anti-inflamatorio y su capacidad de migración hacia tejidos con procesos inflamatorios las hace una herramienta idónea para la regeneración tisular.

Una herramienta fundamental en el estudio de la incontinencia anal es la obtención de un modelo animal, que permita reproducir la patología lo más fielmente posible y en el que además se pueda desarrollar y ensayar nuevas terapias. Tal y como se ha comentado en la introducción, esta patología tiene diversas causas (anatómicas, congénitas, neurológicas, y funcionales) por lo que desarrollar un modelo animal en rata que las aúne a todas es muy complicado. El hecho de obtener un modelo mediante una sección directa de ambos esfínteres (esfinterotomía), podría solventar una de las causas que más prevalencia genera entre las mujeres debido a los daños sufridos durante el parto.

Lorenzi y col.⁵⁰ publicaron un estudio sobre incontinencia anal en rata realizada por sección del esfínter y la posterior inyección de BM-MSCs, observando formación de nuevos miotubos y miofibras, lo que incrementaría la capacidad de contracción de los esfínteres después de realizar la lesión y su posterior reparación. Ese mismo año, Wai y col.^{78,79} publicaron estudios sobre incontinencia así como el modelo animal en rata conseguido mediante distensión vaginal, sección del esfínter o en combinación.

Observaron que únicamente la distensión vaginal, no tenía efectos sobre la funcionalidad del esfínter debiendo existir un problema mecánico subyacente, de manera que aunque la integridad del tejido sea importante para el correcto funcionamiento del tejido, otros factores deben de contribuir en la recuperación de la funcionalidad del mismo.

Otro modelo usado es la sección del nervio pudendo. Zutshi y col.⁵² desarrollaron un modelo de incontinencia mediante la sección, unilateral o bilateral, del nervio pudendo o mediante sección de ambos esfínteres. Mientras que en la esfinterotomía se seguía observando actividad del esfínter, los datos obtenidos en la electromiografía realizada, inmediatamente después de lesionar el nervio pudendo, mostraban un descenso en la actividad del músculo, respecto de los animales sanos, explicando esta diferencia por la existencia de fibras musculares sanas después de realizar la esfinterotomía. Salcedo y col.⁵¹ realizaron el mismo estudio comparativo que Zutshi y col. observando que la presión anal se recobraba a los 14 días de realizar la esfinterotomía siendo los valores comparables a los de los controles. Sin embargo, los valores de la presión anal obtenidos tras la sección del nervio pudendo fueron significativamente menores tras 4 días a los obtenidos en los controles, los cuales se mantuvieron hasta los 28 días tras la lesión.

Los diferentes modelos estudiados hasta ahora, se han desarrollado en diferentes animales como el conejo o la zarigüeya, pero sin duda alguna el animal más empleado ha sido la rata. Una limitación del estudio de la incontinencia anal es que, al contrario de lo que ocurre en ratas, en los humanos no hay regeneración tisular después de un desgarro completo ni una recuperación funcional del esfínter a no ser que haya una reparación quirúrgica del mismo⁵¹. Sin embargo, las ratas poseen una capacidad de regeneración tisular enorme, lo que hace que aunque en el proceso regenerativo del tejido se haya producido fibrosis⁵¹, éste se comporte como un tejido sano, dificultando realizar estudios funcionales a largo plazo con los que

obtener conclusiones sólidas. Aunque la anatomía y fisiología del canal anal ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos animales, no hay un modelo animal *in vivo* de daño en el esfínter anal que permita estudiar los cambios en la presión de reposo a tiempo real después de la lesión⁵².

1. Estudio de contractibilidad del tejido y evolución histológica del daño en el esfínter

1.1. Estudio de contractibilidad muscular en tejidos lesionados con ASCs

Mientras que el estudio histológico del daño realizado en el esfínter mostraba una pauta de regeneración tisular (figura 8), los resultados del baño de órganos indicaban un comportamiento distinto a lo que cabría esperar en base a la histología. Aunque el tejido una semana después de haber realizado el daño presentaba una sección completa de la capa muscular (figura 8G y H) el baño de órganos mostraba un comportamiento casi como el obtenido en los tejidos sanos (gráficas 1, 2 y 3). Cuatro semanas después de lesionar el músculo, el tejido se había reparado en cierta manera, generándose fibrosis en la zona de la herida así como una hernia de la mucosa (figura 8K y L), sin embargo el funcionamiento del músculo dañado era como el de un músculo sano. Donde se obtuvieron diferencias claras en cuanto al funcionamiento muscular fue a los 4 días de realizar la herida, observándose una disminución en la capacidad de contracción del tejido frente a la obtenida en los tejidos sanos. Puesto que, a nivel funcional, no existían diferencias entre un músculo sano y uno dañado a la semana y 4 semanas después de haber sido lesionado el esfínter, se quiso estudiar el efecto de las ASCs únicamente a los 4 días de haberse realizado la sección del esfínter.

Analizando la histología 4 días después de haber realizado la herida (figura 8E y F), se observó una sección completa del músculo, lo que concordaría con la pérdida en la capacidad de contracción del tejido (gráficas 1, 2 y 3).

Cuatro días después de inyectar las ASCs, tanto en proliferación como cultivadas en medio de diferenciación, se obtuvo una recuperación en los valores de contracción mediada por los receptores β -adrenérgicos, siendo éstos casi como los de un músculo sano. Sin embargo, aunque los valores obtenidos en el baño de órganos son notablemente buenos, la histología nos revela que el músculo, aun habiendo inyectado ASCs, presenta una sección completa de la capa muscular. Lo que podría haber ocurrido es que la presencia de ASCs en el medio favorezca la actividad de las fibras musculares, haciendo que aunque haya interrupción del anillo muscular las miofibras sean capaces de contraerse o relajarse como un tejido sano en presencia de alguno de los fármacos.

En la actualidad no hay muchos estudios sobre incontinencia anal y posibles terapias alternativas a la cirugía, fuera de la inyección de agentes de relleno o electroestimulación. En humanos, el único estudio de terapia celular para incontinencia anal publicado hasta la fecha⁵⁹ es un ensayo clínico piloto con 10 mujeres con incontinencia anal por desgarros obstétricos, en las que se inyectaron mioblastos autólogos en el esfínter anal externo con ayuda ecográfica, a las cuales se les hizo un seguimiento después de la operación durante un año. Aunque la terapia celular resultó factible y segura, y mostró algunos indicios de eficacia (mejora en el índice Wexner de incontinencia, menos episodios de incontinencia), lo que aumentaba la calidad de vida de las pacientes, no se encontraron cambios estructurales ni fisiológicos que explicasen esa mejoría. Los autores reconocen las limitaciones del reducido número de pacientes e incluso un posible efecto positivo de la mera inyección en el esfínter.

En 2010 White y col.⁸⁰, basándose en un modelo animal ya establecido de incontinencia anal mediante distensión vaginal o sección del esfínter, como el de Wai y col.^{78,79}, propusieron el uso de células satélite como método para mejorar la incontinencia.

Observaron, mediante estudios neurofisiológicos, que al cabo de **90 días** de haber realizado la sección del esfínter la pauta de comportamiento del tejido sano y del dañado era la misma, lo que concordaría con lo observado en el presente estudio para los tejidos lesionados a la semana y 4 semanas sin ASCs. De esta manera, la fibrosis generada en la reparación del tejido, serviría para que el anillo muscular mantuviera la estructura circular íntegra y que el músculo se comportase como un tejido sano⁷⁹. Sin embargo los resultados obtenidos en dicho estudio en aquellos tejidos dañados con células a los **7 días** tras la inyección no fueron tan positivos. Al contrario de lo observado en nuestro estudio, White y col.⁸⁰ no encontraron mejoría, a tiempos cortos, en el patrón de comportamiento de aquellos tejidos dañados a los cuales se les había inyectado células satélite.

Tras diversos estudios, se ha sabido que las células satélite se encuentran quiescentes en una fase temprana del programa de diferenciación miogénico, activándose la proliferación y el proceso de diferenciación ante un daño en el tejido muscular esquelético⁸¹. Se piensa que señales como la respuesta inflamatoria podrían también activarlas³⁶. Si éstas células ya están programadas hacia una estirpe celular en concreto, cabría esperar que aquellos factores de crecimiento que secretan las MSCs en el proceso de regeneración tisular, no sean expresados por las células satélite, por lo que la mejoría mostrada por los tejidos con ASCs en proliferación no se dé en tejidos a los que se les ha inyectado células satélite.

En 2012 Pathi y col.⁸², del mismo grupo de la Universidad Sothwestern de Texas, estudiaron el efecto de las MSCs inyectadas directamente en la zona de daño, realizando pruebas neurofisiológicas únicamente 21 días después de haber inyectado las células. Los resultados obtenidos fueron muy positivos, observando mejoría en cuanto a la capacidad contráctil del músculo 3 semanas después de la inyección. Según los resultados del baño de órganos de tejidos dañados en nuestro estudio, después de la primera semana de haber

realizado el daño en el músculo, a nivel funcional, se comporta como un tejido sano por lo que la inyección de MSCs sería innecesaria. Por este motivo, sería interesante realizar los estudios de funcionalidad en periodos de tiempo inferiores a una semana.

1.2. Efecto de las ASCs, en proliferación y con fenotipo miogénico, en la cicatrización del esfínter dañado

Los estudios histológicos realizados a las 4 semanas en aquellos tejidos a los que se les inyectaron ASCs en proliferación (figura 20) únicamente mostraron una pequeña cicatriz en la zona de la herida, la cual era menor a la observada en tejidos con ASCs con fenotipo miogénico (figura 25), en los cuales se llegaba a ver herniación de la mucosa.

Se han descrito una gran variedad de factores de crecimiento que intervienen en la reparación de un tejido dañado, tales como EGF, FGF, PDGF, TGF- β , VEGF, así como algunas hormonas, citoquinas y quimioquinas⁸³⁻⁸⁵. Aunque se tiene claro el papel que cada uno de estos factores realiza en el proceso de cicatrización, se desconoce cómo las MSCs intervienen en este complejo proceso o cual es el papel que desempeñan⁸⁶.

En base a artículos publicados en los que se señala el papel beneficioso de las MSCs en el proceso de regeneración tisular, lo que se esperaba, a priori, es que la fibrosis no hubiera tenido lugar en ninguno de los tejidos lesionados con ASCs a las 4 semanas, ya que éstas ayudarían a que el tejido regenerara de manera adecuada. Aunque se sabe que las MSCs son capaces de liberar metaloproteasas de matriz al medio⁸⁷⁻⁹⁰, lo cual evitaría la formación de fibrosis, la aparición de la misma podría ser debida a que la dosis celular inyectada en los animales (10^6 células) no es la suficiente como para evitar su aparición, haciendo falta aumentarla para que haya una regeneración del tejido muscular, de manera que aumenten los niveles de metaloproteasas de matriz localmente, eliminando así la fibrosis.

Sin embargo, todos aquellos factores liberados por parte de las ASCs que ayudan en el proceso de cicatrización, se podrían haber visto comprometidos debido al proceso de diferenciación miogénica, no liberándose al medio y formándose la fibrosis al igual que ocurría en los tejidos lesionados a las 4 semanas sin ASCs (figura 8K y L).

Recientemente, Yeum y col.⁹¹ quisieron analizar el porcentaje de BM-MSCs que realmente intervienen en la reparación de un tejido, en este caso, una lesión en la piel. Los resultados obtenidos mostraron que sólo una parte de éstas actúan en la reparación del tejido, aunque dicho porcentaje varía en función del tamaño de la herida realizada. Así, una aplicación repetida de BM-MSCs en la zona de la herida no incrementa el porcentaje de células que participan en la reparación del tejido⁹¹, sino que mantendría el número óptimo de células requeridas en la regeneración tisular. Así pues, lo importante no sería administrar una única dosis muy alta, sino varias dosis de forma constante, de manera que una vez que el porcentaje óptimo de MSCs han completado su función en el proceso de regeneración tisular, una nueva dosis sería necesaria para reemplazarlas.

La dosis de ASCs/MSCs que se administra, ya sea en los modelos animales de experimentación o bien en la clínica, ha sido un punto importante. En la clínica, en los últimos años, se ha tendido a aumentarla de manera progresiva. En 2005, en el primer ensayo clínico en fase I para tratar fístulas complejas en pacientes con Enfermedad de Chron, llevado a cabo por el Hospital de La Paz⁵⁷, la dosis administrada estaba entre 3,5 y 30 millones de ASCs por paciente. En estudios posteriores en fase II⁵⁸ y en fase III⁹² dicha dosis se incrementó, administrando una primera dosis de 20 millones de ASCs por paciente y una segunda de 40 millones en el caso de que la fistula no hubiera cicatrizado.

Actualmente en un ensayo clínico liderado por la Clínica Universitaria de Navarra también para patología fistulosa en pacientes con enfermedad de Chron (Eudra CT nº 2009-009880.71), se están implantando 200 millones de ASCs autólogas (www.clinicaltrials.gov; NCT 01157650). Recientemente se han presentado datos del efecto de diversas dosis de células autólogas derivadas de músculo (AMDC)(10 millones-200 millones) para el tratamiento de incontinencia urinaria por estrés, mostrando mejor eficacia a dosis altas de AMDC (200 millones)⁹³.

Cada vez más, se tiende a la conclusión de que los efectos beneficiosos de las MSCs pueden ser debidos a dos posibles mecanismos de acción reparativa: 1) mediante una diferenciación *in situ* de ellas mismas, incorporándose a la arquitectura celular o bien 2) que éstas, una vez han llegado al tejido dañado, liberen factores solubles que actúen de forma paracrina sobre las células cercanas, ayudando a la regeneración del tejido, inhibiendo la apoptosis y estimulando la mitosis de las MSCs o de las células progenitoras propias del tejido^{85,94,95}.

Cabría la posibilidad de que durante la reparación del esfínter, las ASCs se hubieran integrado en el tejido dañado, como se ha comprobado en publicaciones anteriores^{15,49,50}. Los datos obtenidos por microscopía de fluorescencia muestran resultados distintos. Las ASCs-GFP, en proliferación como con fenotipo miogénico, se hallaron concentradas principalmente entre la mucosa y el anillo de músculo a los 4 días (figuras 18, 19, 23 y 24) o bien en zonas más internas de la mucosa a las 4 semanas (figuras 20, 22, 25 y 27) de haber sido inyectadas, no entre las fibras musculares del EAE o EAI, lo que sugiere que las ASCs en vez de diferenciarse a células musculares o fusionarse con ellas, favorecerían la formación de nuevas fibras musculares¹⁴, o al menos mantendrían el funcionamiento de las existentes.

Los resultados para Ki-67 en tejidos con ASCs en proliferación como con fenotipo miogénico, tras 4 días de ser inyectadas (figuras 29 y 31), nos muestran que la mayoría de ellas se encuentran en estado quiescente, por lo que durante las primeras fases de regeneración, el mecanismo de actuación de estas células no sería la proliferación. Tras 4 semanas, no se encontraron ASCs en proliferación positivas para Ki-67 (figura 30), ni en la zona donde se encontraron por microscopía de fluorescencia (figura 22) ni en ninguna otra región. Sin embargo, en aquellos tejidos con ASCs con fenotipo miogénico sí que se encontraron ASCs positivas para Ki-67 (figura 32), pudiendo este hecho ser un mecanismo alternativo de regeneración tisular, de manera que la carencia de secreción de factores de crecimiento por parte de las ASCs causada en el proceso de diferenciación, podría ser la señal necesaria para activar el ciclo celular y por tanto el inicio de la proliferación celular.

Todos estos datos apoyarían la teoría de que la secreción de factores solubles, por parte de las ASCs, sea lo que incremente o ayude a la cicatrización del tejido, ya sea porque aumente la concentración de los factores de crecimiento existentes en el medio o bien porque dichos factores actúen de manera paracrina sobre las células cercanas, haciendo que éstas liberen al medio más factores que agilicen la cicatrización.

2. Diferenciación miogénica y patrón de expresión de marcadores musculares

Zuk y col. propusieron un protocolo, ampliamente seguido por diferentes grupos de investigación a lo largo de estos años^{73-75,96,97}, por el cual se conseguía diferenciar ASCs humanas hacia un **fenotipo muscular estriado**. Tras 6 semanas en cultivo con medio de diferenciación nuestros resultados son distintos a los publicados, observándose tanto en las células en proliferación así como en las diferenciadas, expresión de cald1, smnt, α -actina y MYH11. Sólo se encontró expresión de los marcadores de músculo estriado (MyoD1, Myf6 y MYH2) en el control positivo de músculo estriado (figura 13).

Realizada la PCR a tiempo real se pudo comprobar, que tanto *cald1* como *smnt* (gráfica 6) se expresaban más en las células en diferenciación respecto de las células en proliferación, con o sin dexametasona en el medio de cultivo, mientras que la expresión de α -actina y MYH11 de músculo liso parecían ir inhibiéndose en aquellas células con medio de diferenciación a medida que aumentaba el tiempo en cultivo.

Es muy llamativo el hecho de que un mismo protocolo produzca dos resultados tan dispares. Aunque en ambos casos, el origen de las células es el mismo, el tejido adiposo, la especie de la que proceden no lo es. Hasta el momento no se ha encontrado ninguna publicación que diferencie células de rata a células de músculo liso o estriado. Todos los estudios realizados se han hecho en células humanas, ya sean derivadas de médula ósea o de tejido adiposo, lo que hace muy complicado poder comparar los resultados obtenidos en este estudio con alguno ya publicado.

Ya que el origen de las células era distinto, cabría la posibilidad de que, aunque el protocolo de diferenciación funcione en células humanas, como ya se ha demostrado, no sea el más idóneo para realizar la diferenciación con células de rata, haciendo falta aumentar o disminuir la concentración de alguno de los componentes del medio de diferenciación o incluso añadir algún componente más que permita una diferenciación a músculo estriado. Hace falta realizar los estudios pertinentes que permitan apoyar o descartar esta hipótesis.

Si bien es cierto que todos los marcadores utilizados en esta tesis, se consideran marcadores de músculo liso, hay artículos que demuestran que su expresión no es tan específica como cabría esperar, encontrándose estas proteínas en tejidos que poco tienen que ver con la musculatura lisa^{98,99}. Diferentes análisis realizados sobre la expresión y localización de **MYH11**, la sitúan principalmente en células contráctiles¹⁰⁰, aunque también se ha localizado en miofibroblastos, células endoteliales e incluso en cierta clase de tumores.

La **α -actina**, primera proteína contráctil en ser postulada como marcador específico, se expresa, no sólo en el músculo liso, sino también, de forma temporal, en la diferenciación de músculo cardíaco, esquelético y miofibroblastos. La **caldesmona** también ha sido considerada como un posible marcador. Estudios de inmunohistoquímica la sitúan en el desarrollo de vasos sanguíneos, aunque su localización específica en tejidos musculares lisos todavía no está del todo clara. **Smoothelin**, expresada en células musculares, sin función conocida hasta el momento, ha sido propuesta como un marcador de diferenciación muy tardío. Se ha hipotetizado acerca de su función, creyendo, algunos autores, que su expresión está únicamente limitada a aquellas células capaces de generar una contracción, pudiéndose considerar como un marcador específico de músculo liso contráctil, aunque también hay estudios que demuestran que es expresada, a niveles altos, en ciertos órganos y tejidos como corazón, riñón y cerebro. Además se ha podido comprobar que todos estos marcadores son expresados también en ASCs en proliferación (figura 13).

Actualmente, no existe un protocolo universal en el que basarse para realizar la diferenciación a músculo liso. Harris y col.¹⁰¹ realizaron un estudio comparativo entre 3 protocolos distintos de diferenciación, publicados con anterioridad, con el objetivo de analizar si el patrón de expresión de 5 marcadores típicos de músculo liso (ASMA, SM22, calponina, cald1 y MYH11) era el mismo o parecido entre los diferentes protocolos. Mientras que en los artículos de Rodríguez, Jeon y Young^{100,102,103}, demostraban la sobre-expresión de dichos marcadores mediante PCR y western blot, Harris y col. obtuvieron resultados contradictorios con los mismos protocolos de diferenciación, ya que la expresión de estos marcadores variaba en función del protocolo utilizado y de la línea celular utilizada, achacando estas diferencias tanto a una diferencia en el medio de cultivo utilizado, así como a la edad de los pacientes utilizados en el estudio.

Así pues, independientemente del protocolo escogido y de la posible variabilidad en la expresión de los marcadores analizados, la expresión de las proteínas contráctiles y citoesqueléticas en conjunto es lo que define a una célula de músculo liso madura¹⁰⁰. La carencia de MYH11 y α -actina, bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, sugiere la posibilidad de que las células se encuentren en un estadio inicial de diferenciación y que haga falta más tiempo en cultivo para llegar a un estado más maduro¹⁰⁴ y a la expresión de todas las proteínas características del músculo liso.

3. Expresión de receptores de quimioquinas (CCR1, CCR2 y CXCR4) en ASCs en proliferación y ASCs con medio de diferenciación, así como expresión de sus ligandos MCP-3 y SDF-1 en tejidos sanos y dañados

En el caso de las células en proliferación, se observó expresión tanto **CCR1** como **CXCR4** (figura 34), mientras que para las células con medio de diferenciación, únicamente a una semana sin dexametasona se obtuvo un descenso en la expresión de ambos receptores, no observándose diferencias durante el resto del tratamiento. El patrón de expresión para **CCR2** fue distinto (figura 34), ya que al contrario de lo obtenido para los otros dos receptores, ni las células en proliferación ni células a una semana sin dexametasona y 6 semanas con dexametasona lo expresaban.

El uso de MSCs en estudios clínicos ha aumentado cada vez más debido a su capacidad de migrar cuando son inyectadas de forma intravenosa, hacia tejidos dañados o que presentan procesos inflamatorios^{39,40,85,105}. Aunque el mecanismo de migración de estas células hacia los tejidos dañados no se ha llegado a comprender del todo^{94,106}, cada vez se tiene más claro que las quimioquinas actúan como quimioatrayentes de las MSCs guiándolas hacia la zona de daño^{38,39,106}.

La presencia de receptores de quimioquinas en células que han sido sometidas a diferenciación llama la atención, ya que cabría esperar que su expresión fuera disminuyendo conforme éstas se fueran diferenciando a lo largo de las 6 semanas en cultivo. En 2010, Griffin y col.¹⁰⁷ publicaron un artículo en el que demostraban que durante la formación de músculo estriado, tanto en fases iniciales de la miogénesis así como en las más tardías, se expresaban tanto receptores de quimioquinas como sus ligandos. Esto mismo podría ocurrir en la formación del músculo liso, lo que sugeriría que estas células, al expresar los receptores **CCR1** y **CXCR4** (figura 34) no están diferenciadas, si no que serían células musculares inmaduras en proceso de diferenciación, ratificando, de esta manera, la idea postulada en base a los resultados obtenidos para la MYH11 y la α -actina (gráfica 6 y figura 13).

Con respecto a los resultados obtenidos para el receptor **CCR2**, fue muy llamativo el hecho de que las células en proliferación no expresaran dicho receptor, ya que artículos previos describían la expresión del mismo en MSCs humanas. Chamberlain y col.¹⁰⁶ realizaron un estudio comparativo de la expresión de receptores de quimioquinas entre MSCs humanas y murinas, demostrando que la expresión de receptores de quimioquinas es distinta entre las dos especies. Sería razonable pensar en el hecho de que el patrón de expresión de receptores de quimioquinas en ASCs de rata sea distinto al de las células humanas o a las de ratón. Analizando los resultados de la PCR para CCR2 (figura 34), se observó que a medida que aumentaba el tiempo en cultivo con el medio de diferenciación, la expresión del receptor iba disminuyendo. Podría ocurrir que CCR2 fuera necesario, únicamente, en la fase inicial de diferenciación, perdiéndose a medida que dichas células se fueran diferenciando a células musculares maduras. Hacen falta más estudios para entender bien el porqué este receptor se expresa de esta manera.

Los resultados obtenidos para la expresión de las quimioquinas **MCP-3 y SDF-1** (figura 36), en tejidos sanos así como en los dañados, revelaron que la expresión de MCP-3 no se veía afectada por la presencia de ASCs en proliferación o tratadas con medio de diferenciación al cabo de 4 días o 1 semana tras la inyección de las células, mientras que para SDF-1 se vio un descenso gradual en su expresión a medida que aumentaba el tiempo de estudio, siendo esta disminución algo mayor cuando se inyectaban células diferenciadas. La expresión de ambas quimioquinas era prácticamente nula al cabo de un mes de realizar la herida (figura 35).

El escoger estas dos quimioquinas se debe a estudios previos de Woo y col.^{108,109}, en los cuales demostró en un modelo de rata de incontinencia urinaria generada por distensión vaginal, que en el recto, tejido afectado durante el proceso, no había sobre-expresión de MCP-3 pero sí de SDF-1. Posteriormente Salcedo y col.¹¹⁰ observaron que tras un daño en el esfínter anal, ya sea por daño en el nervio pudiendo o por esfinterotomía, existía un incremento de ambas quimioquinas, aunque sus niveles de expresión variaban en función de cómo se realizaba el daño, contradiciendo los resultados previos de Woo y col.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio apoyarían a los obtenidos por Woo y col. Los niveles de MCP-3, tanto en los tejidos dañados como en los inyectados con ASCs, son los mismos a los encontrados en tejidos sanos, comprobando que aunque el tejido este dañado, los niveles de MCP-3 no se ven incrementados por encima de los basales, por lo que la presencia de ASCs no afectaría en la regulación de esta quimioquina en este tejido en concreto. En relación a **SDF-1**, sí que se observaron diferencias entre los tejidos dañados y aquellos a los que se les habían inyectado células, tanto en proliferación como con medio de diferenciación. Este resultado sugeriría que la presencia de ASCs en el tejido dañado, podría disminuir el efecto inmunomodulador de SDF-1 liberada por los tejidos dañados.

Teniendo en cuenta todo lo comentado hasta el momento y de los resultados obtenidos, sería conveniente realizar más estudios aumentando la cantidad de ASCs administradas en los animales, intentando de esta manera evitar la aparición de fibrosis y por tanto una correcta reparación del tejido muscular.

Conclusiones

“Conclusión es el lugar donde llegas cansado de pensar”

A la luz de los resultados obtenidos en el presente estudio, y de los objetivos planteados inicialmente, se pueden extraer las siguientes conclusiones

1. Se ha logrado desarrollar un modelo animal para incontinencia anal, observando alteraciones funcionales en el tejido en la fase aguda del daño, aunque dicha disfunción mejora en estados crónicos.
2. El protocolo de diferenciación miogénico utilizado permite la diferenciación de las ASCs hacia un fenotipo muscular liso en lugar de estriado.
3. Dicha diferenciación miogénica no es completa, ya que no se expresan todas las proteínas contráctiles y citoesqueléticas típicas del músculo liso, quedándose las ASCs en una fase inicial del proceso de diferenciación.
4. La capacidad contráctil del tejido muscular dañado se recupera en presencia de las ASCs inyectadas, tanto diferenciadas como no diferenciadas, comportándose dichos tejidos como un tejido sano.
5. Las ASCs en proliferación, inyectadas en los tejidos, favorecen la regeneración tisular de manera más efectiva frente a las ASCs cultivadas con medio de diferenciación miogénico.
6. La expresión de **SDF-1** disminuye en presencia de ASCs, lo que demuestra el papel inmunomodulador de este tipo de células, mientras que **MCP-3** a lo largo del tiempo no se ve alterada por la presencia de ASCs en el tejido dañado.
7. La expresión de los receptores CCR1 y CXCR4 en ASCs no se ve afectada al cabo de las 6 semanas del proceso de diferenciación miogénico *in vitro*.

8. El receptor CCR2, aunque no es expresado por las ASCs en proliferación, durante el proceso de diferenciación miogénico sí que se expresa, aunque va desapareciendo a medida que aumenta el tiempo en cultivo, pudiendo obedecer esto a la necesidad de su expresión en fases iniciales de la diferenciación.

Bibliografía

“¿Quién dijo que el saber no ocupa lugar?”

- 1 Drossman, D. A. *et al.* U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Dig Dis Sci* **38**, 1569-1580, (1993).
- 2 Thompson, W. G. *et al.* Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* **45 Suppl 2**, II43-47, (1999).
- 3 Frances, A. *et al.* *DSM-IV-TR. Manual diagnóstico y estadístico de los transtornos mentales. IV - Texto revisado.* 1ed edn, (Elsevier-Masson, 2001).
- 4 Whitehead, W. E. *et al.* Functional disorders of the anus and rectum. *Gut* **45 Suppl 2**, II55-59, (1999).
- 5 Johanson, J. F. & Lafferty, J. Epidemiology of fecal incontinence: the silent affliction. *Am J Gastroenterol* **91**, 33-36, (1996).
- 6 Nelson, R. *et al.* Community-based prevalence of anal incontinence. *JAMA* **274**, 559-561, (1995).
- 7 Bharucha, A. E. Incontinence: an underappreciated problem in obesity and bariatric surgery. *Dig Dis Sci* **55**, 2428-2430, (2010).
- 8 Varma, A. *et al.* Obstetric anal sphincter injury: prospective evaluation of incidence. *Dis Colon Rectum* **42**, 1537-1543, (1999).
- 9 Maslekar, S. *et al.* Investigation and treatment of faecal incontinence. *Postgrad Med J* **82**, 363-371, (2006).

- 10 Crowell, M. D. *et al.* Fecal incontinence impact on psychosocial function and health-related quality of life. *Gastroenterology* **114 Suppl 1**, (1998).
- 11 Macmillan, A. K. *et al.* The prevalence of fecal incontinence in community-dwelling adults: a systematic review of the literature. *Dis Colon Rectum* **47**, 1341-1349, (2004).
- 12 Wagner, T. H. & Hu, T. W. Economic costs of urinary incontinence in 1995. *Urology* **51**, 355-361, (1998).
- 13 Xu, X. *et al.* Economic cost of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* **55**, 586-598, (2012).
- 14 Aghaee-Afshar, M. *et al.* Potential of human umbilical cord matrix and rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of surgically incised rabbit external anal sphincter. *Dis Colon Rectum* **52**, 1753-1761, (2009).
- 15 Kajbafzadeh, A. M. *et al.* Functional external anal sphincter reconstruction for treatment of anal incontinence using muscle progenitor cell auto grafting. *Dis Colon Rectum* **53**, 1415-1421, (2010).
- 16 Vaizey, C. J. *et al.* Long-term results of repeat anterior anal sphincter repair. *Dis Colon Rectum* **47**, 858-863, (2004).
- 17 Abrams, P. *et al.* Fourth International Consultation on Incontinence Recommendations of the International Scientific Committee: Evaluation and treatment of urinary incontinence, pelvic organ prolapse, and fecal incontinence. *Neurourol Urodyn* **29**, 213-240, (2010).

-
- 18 Beck, D. E. *et al.* *The ASCRS textbook of colon and rectal surgery*. 2nd edn, (Springer Verlag, 2011).
- 19 Vodusek, D. B. Anatomy and neurocontrol of the pelvic floor. *Digestion* **69**, 87-92, (2004).
- 20 Frenckner, B. & Euler, C. V. Influence of pudendal block on the function of the anal sphincters. *Gut* **16**, 482-489, (1975).
- 21 Hancock, B. D. Measurement of anal pressure and motility. *Gut* **17**, 645-651, (1976).
- 22 McNamara, M. J. *et al.* A manometric study of anal fissure treated by subcutaneous lateral internal sphincterotomy. *Ann Surg* **211**, 235-238, (1990).
- 23 Nelson, T. J. *et al.* Stem cell platforms for regenerative medicine. *Clin Transl Sci* **2**, 222-227, (2009).
- 24 Bianco, P. *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells* **19**, 180-192, (2001).
- 25 Friedenstein, A. J. *et al.* Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-247, (1968).
- 26 Bianco, P. *et al.* Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* **2**, 313-319, (2008).

-
- 27 Garcia-Gomez, I. *et al.* Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* **10**, 1453-1468, (2010).
- 28 Horwitz, E. M. *et al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8932-8937, (2002).
- 29 Shake, J. G. *et al.* Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* **73**, 1919-1925; discussion 1926, (2002).
- 30 Kolf, C. M. *et al.* Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* **9**, 204, (2007).
- 31 Deasy, B. M. *et al.* Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis* **27**, 924-933, (2001).
- 32 Watt, F. M. & Driskell, R. R. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 155-163, (2010).
- 33 Hombach-Klonisch, S. *et al.* Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)* **86**, 1301-1314, (2008).
- 34 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, (2006).

-
- 35 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, (2007).
- 36 Yablonka-Reuveni, Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *J Histochem Cytochem* **59**, 1041-1059, (2011).
- 37 Phinney, D. G. & Prockop, D. J. Concise review: mesenchymal stem /multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes repair-current wiews. *Stem cells* **25**, 2896-2902, (2007).
- 38 Baek, S. J. *et al.* In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med* **43**, 596-603, (2011).
- 39 Salem, H. K. & Thiemermann, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* **28**, 585-596, (2010).
- 40 Chamberlain, G. *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739-2749, (2007).
- 41 Singer, N. G. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* **6**, 457-478, (2011).
- 42 García-Olmo, D. *et al.* *Cell Therapy*. 1st edn, (McGraw-Hill-Interamericana, 2008).

-
- 43 De Ugarte, D. A. *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **174**, 101-109, (2003).
- 44 Reya, T. *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111, (2001).
- 45 Van Zant, G. & Liang, Y. The role of stem cells in aging. *Exp Hematol* **31**, 659-672, (2003).
- 46 Daley, G. Q. *et al.* Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 398-418, (2003).
- 47 Weissman, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* **287**, 1442-1446, (2000).
- 48 Healy, C. F. *et al.* Experimental models of neuropathic fecal incontinence: an animal model of childbirth injury to the pudendal nerve and external anal sphincter. *Dis Colon Rectum* **51**, 1619-1626; discussion 1626, (2008).
- 49 Kang, S. B. *et al.* Sphincter contractility after muscle-derived stem cells autograft into the cryoinjured anal sphincters of rats. *Dis Colon Rectum* **51**, 1367-1373, (2008).
- 50 Lorenzi, B. *et al.* Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Dis Colon Rectum* **51**, 411-420, (2008).

-
- 51 Salcedo, L. *et al.* Long-term effects on pressure and electromyography in a rat model of anal sphincter injury. *Dis Colon Rectum* **53**, 1209-1217, (2010).
- 52 Zutshi, M. *et al.* Effects of sphincterotomy and pudendal nerve transection on the anal sphincter in a rat model. *Dis Colon Rectum* **52**, 1321-1329, (2009).
- 53 Fillmann, H. S. *et al.* Diabetes mellitus and anal sphincter pressures: an experimental model in rats. *Dis Colon Rectum* **50**, 517-522, (2007).
- 54 Yiou, R. *et al.* Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int* **89**, 298-302, (2002).
- 55 Furuta, A. *et al.* Advances in the understanding of stress urinary incontinence and the promise of stem-cell therapy. *Rev Urol* **9**, 106-112, (2007).
- 56 Mo, R. *et al.* Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. *Am J Pathol* **159**, 765-774, (2001).
- 57 Garcia-Olmo, D. *et al.* A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* **48**, 1416-1423, (2005).
- 58 Garcia-Olmo, D. *et al.* Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* **52**, 79-86, (2009).

- 59 Frudinger, A. *et al.* Muscle-derived cell injection to treat anal incontinence due to obstetric trauma: pilot study with 1 year follow-up. *Gut* **59**, 55-61, (2010).
- 60 Banwait, K. S. & Rattan, S. Role of nitric oxide in beta3-adrenoceptor activation on basal tone of internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G547-555, (2003).
- 61 Chakder, S. *et al.* Mechanism of internal anal sphincter smooth muscle relaxation by phorbol 12,13-dibutyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G1341-1350, (2001).
- 62 De Godoy, M. A. *et al.* Evidence for the role of angiotensin II biosynthesis in the rat internal anal sphincter tone. *Gastroenterology* **127**, 127-138, (2004).
- 63 De Godoy, M. A. & Rattan, S. Autocrine regulation of internal anal sphincter tone by renin-angiotensin system: comparison with phasic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G1164-1175, (2005).
- 64 Fan, Y. P. *et al.* Mechanism of action of cholera toxin on the opossum internal anal sphincter smooth muscle. *Am J Physiol* **277**, G152-160, (1999).
- 65 Fan, Y. P. *et al.* Animal model for angiotensin II effects in the internal anal sphincter smooth muscle: mechanism of action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G461-469, (2002).

-
- 66 Hecker, L. *et al.* Development of a three-dimensional physiological model of the internal anal sphincter bioengineered in vitro from isolated smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G188-196, (2005).
- 67 Li, F. *et al.* Role of adenylate and guanylate cyclases in beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 1111-1120, (2004).
- 68 Moummi, C. & Rattan, S. Effect of methylene blue and N-ethylmaleimide on internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* **255**, G571-578, (1988).
- 69 Rattan, S. *et al.* Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO, and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G605-611, (2004).
- 70 Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317, (2006).
- 71 Schaffler, A. & Buchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* **25**, 818-827, (2007).
- 72 Deasy, B. M. *et al.* Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell* **16**, 3323-3333, (2005).

-
- 73 Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-228, (2001).
- 74 Mizuno, H. *et al.* Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* **109**, 199-209; discussion 210-191, (2002).
- 75 Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279-4295, (2002).
- 76 ABI Prism 7700 sequence detection system. User bulletin # 2. (1997).
- 77 Wang, X. *et al.* Expression of monocyte chemotactic protein-3 mRNA in rat vascular smooth muscle cells and in carotid artery after balloon angioplasty. *Biochim Biophys Acta* **1500**, 41-48, (2000).
- 78 Wai, C. Y. *et al.* Effect of prolonged vaginal distention and sphincter transection on physiologic function of the external anal sphincter in an animal model. *Obstet Gynecol* **111**, 332-340, (2008).
- 79 Wai, C. Y. *et al.* Recovery of external anal sphincter contractile function after prolonged vaginal distention or sphincter transection in an animal model. *Obstet Gynecol* **111**, 1426-1434, (2008).
- 80 White, A. B. *et al.* Effect of myogenic stem cells on contractile properties of the repaired and unrepaired transected external anal sphincter in an animal model. *Obstet Gynecol* **115**, 815-823, (2010).

-
- 81 Karalaki, M. *et al.* Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* **23**, 779-796, (2009).
- 82 Pathi, S. D. *et al.* Recovery of the injured external anal sphincter after injection of local or intravenous mesenchymal stem cells. *Obstet Gynecol* **119**, 134-144, (2012).
- 83 Barrientos, S. *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* **16**, 585-601, (2008).
- 84 Raja *et al.* Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* **12**, 2849-2868, (2007).
- 85 Stappenbeck, T. S. & Miyoshi, H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science* **324**, 1666-1669, (2009).
- 86 Ito, H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol* **21**, 113-121, (2011).
- 87 Long, R. A. *et al.* The role of MMP-I up-regulation in the increased compliance in muscle-derived stem cell-seeded small intestinal submucosa. *Biomaterials* **27**, 2398-2404, (2006).
- 88 Miyagi, S. P. *et al.* Dental pulp stem cells express proteins involved in the local invasiveness of odontogenic myxoma. *Braz Oral Res* **26**, 139-144, (2012).

-
- 89 Shirvaikar, N. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. *Biochem Res Int* **2012**, 685267, (2012).
- 90 Yagi, H. *et al.* Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* **19**, 667-679, (2010).
- 91 Yeum, C. E. *et al.* Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*, (2012).
- 92 Herreros, M. D. *et al.* Autologous Expanded Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Complex Cryptoglandular Perianal Fistulas: A Phase III Randomized Clinical Trial (FATT 1: Fistula Advanced Therapy Trial 1) and Long-term Evaluation. *Dis Colon Rectum* **55**, 762-772, (2012).
- 93 Peters, K. *et al.* in *American Urological Association Annual Meeting* Vol. Late Breaking Science Forum LBA9 (Atlanta, GA, 2012).
- 94 Fong, E. L. *et al.* Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials* **32**, 395-409, (2011).
- 95 Phinney, D. G. & Prockop, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902, (2007).

-
- 96 de Villiers, J. A. *et al.* Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* **5**, 256-265, (2009).
- 97 Jack, G. S. *et al.* Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol* **174**, 2041-2045, (2005).
- 98 Hungerford, J. E. & Little, C. D. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* **36**, 2-27, (1999).
- 99 Owens, G. K. *et al.* Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767-801, (2004).
- 100 Rodriguez, L. V. *et al.* Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12167-12172, (2006).
- 101 Harris, L. J. *et al.* Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *J Surg Res* **168**, 306-314, (2011).
- 102 Jeon, E. S. *et al.* Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci* **119**, 4994-5005, (2006).

-
- 103 Kim, Y. M. *et al.* Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2482-2491, (2008).
- 104 Arakawa, E. *et al.* A mouse bone marrow stromal cell line, TBR-B, shows inducible expression of smooth muscle-specific genes. *FEBS Lett* **481**, 193-196, (2000).
- 105 Deak, E. *et al.* Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. *Int Rev Immunol* **29**, 514-529, (2010).
- 106 Chamberlain, G. *et al.* Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS One* **3**, e2934, (2008).
- 107 Griffin, C. A. *et al.* Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J Cell Sci* **123**, 3052-3060, (2010).
- 108 Woo, L. L. *et al.* Over expression of stem cell homing cytokines in urogenital organs following vaginal distention. *J Urol* **177**, 1568-1572, (2007).
- 109 Woo, L. L. *et al.* Simulated childbirth injuries in an inbred rat strain. *Neurourol Urodyn* **28**, 356-361, (2009).
- 110 Salcedo, L. *et al.* Chemokine upregulation in response to anal sphincter and pudendal nerve injury: potential signals for stem cell homing. *Int J Colorectal Dis* **26**, 1577-1581, (2011).

